AUS DEM LANDES-VETERINÄRUNTERSUCHUNGSAMT
FÜR RHEINLAND-PFALZ KOBLENZ
Direktor: Prof. Dr. K. Fritzsche

Untersuchungen über die Möglichkeit der Diagnostik von Coccidien-Species des Huhnes unter besonderer Berücksichtigung serologischer Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität in Gießen

eingereicht von
Peter Steinhagen
Tierarzt aus Schwerin

Gießen
1969

AUS DEM LANDES-VETERINÄRUNTERSUCHUNGSAMT FÜR RHEINLAND-PFALZ
KOBLENZ
Direktor: Prof. Dr. K. Fritzsche

Untersuchungen über die Möglichkeit der Diagnostik von Coccidien - Species des Huhnes unter besonderer Berücksichtigung serologischer Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität in Gießen

eingereicht von
PETER STEINHAGEN
Tierarzt aus Schwerin

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität in Gießen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann
Berichterstatter: Prof. Dr. K. Fritzsche

Tag der mündlichen Prüfung: 3.7.1969

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite:

I EINLEITUNG ..... 1 - 4

II LITERATURÜBERSICHT..... 4 - 6

Untersuchungsmethoden zur Differenzierung der Coccidiosen des Huhnes.

1) Klinische Diagnostik..... 6 - 7

2) Physikalische Untersuchungsmethoden..... 7 - 8

3) Biologisch-physiologische Untersuchungsmethoden..... 8 - 9

4) Deskriptiv pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungsmethoden..... 10-14

5) Immunologische Untersuchungsmethoden..... 14-15

6) Haematologische Untersuchungsmethoden..... 15-16

III BIOLOGIE DER ERREGER..... 16-18

IV IMMUNOLOGIE DER COCCIDIOSEN..... 18-23

V UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER UND SEROLOGISCHER REAKTIONEN IM ANSCHLUSS AN COCCIDIOSEN.

Einführung..... 23-25

1) Agglutinine..... 25-27

2) Präzipitine..... 27-33

3) Lysine..... 33-34

4) Komplementbindende Antikörper..... 34-35

5) Fluoreszenzserologische Untersuchungen..... 35-36

VI EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Material und Untersuchungsmethoden.

1) Versuchstiere..... 37

2) Untersuchte Eimeria-Stämme..... 37

3) Oocystenanreicherung und -reinigung..... 37-38

4) Antigene..... 39-40

5) Antiseren..... 40-43

6) Serumkonzentrat..... 43

7) Serumkontrolle..... 43

8) Agar-Gel-Präzipitationstest..... 43

9) Komplementbindungsreaktion..... 43-44

10) Immunofluoreszenzserologische Untersuchungen..... 44-45

Seite:

11) Histologische Vergleichsuntersuchungen..... 45

VII ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

1) Vorversuche zur Antigen- und Serumgewinnung..... 45-46

2) Agar-Gel-Präzipitationstest..... 46-47

3) Komplementbindungsreaktion..... 47-49

4) Immunofluoreszenzserologische Untersuchung..... 49

VIII DISKUSSION..... 50-55

IX ZUSAMMENFASSUNG..... 56

X LITERATURVERZEICHNIS..... 57-72

LEBENSLAUF..... 73

I. EINLEITUNG

Die Coccidiosen des Huhnes, insbesondere des intensiv gehaltenen Wirtschaftgeflügels, haben verbesserten hygienischen und therapeutischen Möglichkeiten zum Trotz noch immer nichts von ihrer Gefährlichkeit und großen wirtschaftlichen Bedeutung eingebüßt.

HILBRICH (76, 77), DORN (39), RADKE (159) und SIEGMANN und RADKE (186) weisen auf die zunehmende Bedeutung und auf die Verschiebung des Erregerspektrums hin. Angaben über die Höhe des durch Coccidien verursachten Schadens liegen in der neueren Literatur nicht vor. Für das Wirtschaftsjahr 1964 schätzt HILBRICH, daß der Volkswirtschaft ein Schaden von etwa 4 Mrd. DM entstanden wäre, wenn dem Futter keine Coccidiostatica beigemischt gewesen wären.

Mit dem Wandel, der sich im Ablauf etwa der vergangenen 50 Jahre auf dem Gebiet der Geflügelhaltung vollzogen hat, ist auch eine auffällige Änderung gerade dieser parasitären Krankheiten aufgetreten. Coccidien-Species, die bei den natürlichen Haltungsformen keine augenscheinlichen Schäden herbeigeführt hatten, verursachen heute der Geflügelwirtschaft Millionenschäden. Darüber hinaus konnte ein Wechsel unter den befallenen Altersgruppen verzeichnet werden. Nicht mehr das etwa 3 bis 8 Wochen alte Küken, sondern die gerade legereif werdende Junghenne und auch Althennen stellen den Hauptwirt dieser Parasiten dar (SCHNEIDER und HAAS, 193, 195). Es zeigt sich beispielhaft, wie sehr die Umwelt ein Faktor für die Entstehung von Krankheiten ist, in welchem Ausmaß sie die biologischen Eigenschaften einzelner Krankheitserreger verändern kann und damit deren Entwicklungsbedingungen zu begünstigen oder zu benachteiligen in der Lage ist.

HILBRICH (77) unterteilt diese Entwicklung in der BRD in drei Epochen, in denen jeweils eine Änderung in der Verbreitung dieser Parasiten und des Grades ihrer Pathogenität zu beobachten war. Während ein Huhn ursprünglich über eine Stallbodenfläche von 0.25 m^2 und eine Auslauffläche von 10 m^2 verfügte, leben heute in modernen Mastbetrieben bis zu 15 Tiere auf 1 m^2. Der erste Abschnitt erfaßt den Zeitraum bis 1920, der ausschließlich natürlichen Haltung und Vermehrung. Hier hatten die Tiere vom Eintagsküken an Gelegenheit, immer wieder geringe Mengen von Oocysten, die von den Elterntieren ausgeschieden wurden, aufzunehmen, so daß sich allmählich eine sichere Immunität ohne vorausgegangene Er-

krankung entwickeln konnte. Diese wurde durch laufende Aufnahme kleiner Oocystenmengen aufrechterhalten.

Die Zeit zwischen den beiden Weltkriegen mit beginnender Kunstbrut und -aufzucht bei noch überwiegend extensiver Haltungsform sieht der Verfasser als zweite Periode an. Die Gefahr der Massierung von Infektionsmaterial nimmt zu und erreicht während des dritten Abschnittes, der ausschließlichen Intensivhaltung des Wirtschaftsgeflügels, ihren Höhepunkt. Dieser Abschnitt beginnt Ende der Vierziger Jahre. Coccidioseausbrüche wurden zur ständigen und ärgsten Bedrohung der gesamten Nutzgeflügelhaltung.

Einen weiteren Wandel erfuhr das Coccidioseproblem in jüngster Vergangenheit, die als vierte Periode angeführt werden soll. Die Hühnerhaltung in dieser Zeit ist als bisher extremste Form der Intensivhaltung anzusehen und weicht mit der Einführung der Käfige und Batterien am meisten von den natürlichen Gegebenheiten ab. Unter den extrem intensiven Bedingungen ist es dem Küken nicht mehr möglich, Oocysten zur allmählichen Immunisierung aufzunehmen. Werden diese Tiere in einem späteren Entwicklungsabschnitt einem coccidienhaltigen Milieu ausgesetzt, so können Coccidioseformen auftreten, wie sie zuvor nicht zu beobachten waren.

Während unter den hergebrachten Haltungsformen besonders Küken im Alter von 3 - 8 Wochen an der Blinddarmcoccidiose erkrankten (GRZIMEK und GYLSTORFF, 62), weisen DAVIES und Mitarb. (35) und PELLÉRDY (150) darauf hin, daß auch ältere und sogar erwachsene Tiere in Einzelfällen an Blinddarmcoccidiose erkranken können. HORTON-SMITH (86, 88, 89), HORTON -SMITH und LONG (82) und SCHNEIDER und HAAS (195) führten erfolgreich Infestationsversuche mit E. tenella bei älteren Versuchstieren durch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen im Einklang mit denen von SCHOLTYSECK (204), SUPPERER (190) sowie SCHNEIDER und HAAS (193). Gleichzeitig betonen diese Autoren wie auch HEMSLEY (71) und REID und MURPHY (163) den Rückgang der Blinddarm-Coccidiose bei Küken und der Eimeria necatrix - Invasion bei der Junghennenaufzucht, während E. acervulina, E. maxima, E. brunetti und E. mivati immer häufiger als Ursache parasitärer Erkrankung zu finden sind. HILBRICH (77) sieht enge Beziehungen zwischen der Populationsdichte und dem vermehrten Vorkommen von E. acervulina- und E. maxima - Invasionen. Bei diesen beiden Arten sind jeweils größere Oocystenmengen für den

Ausbruch klinisch manifester Erkrankungen notwendig. CLARKE (33) dagegen glaubt eine Begründung des Phänomens der Artenverschiebung in der prophylaktischen Anwendung der gebräuchlichen Coccidiostatica zu finden. HILBRICH (76) wie auch SIEGMANN (187) unterstützen diesen Standpunkt insofern, als auch sie feststellen, daß die zu der Zeit in der Legehennenhaltung zugelassenen Coccidiostatica in der vorgeschriebenen Dosierung die Entwicklung dieser Eimeria-Stämme nur geringfügig beeinflußten, während man sich von der kürzlich erhöhten Dosierung bessere Erfolge verspricht. DORN (39) glaubt eine Begründung dieses Phänomens darin zu sehen, daß die bisher weniger bekannt gewesenen Coccidien-Species im Milieu der intensiven Tiefstreuhaltung nicht nur in der Entwicklung begünstigt, sondern durch vielfache Tierpassagen in ihrer Pathogenität verändert zu werden scheinen. Auch pharmakologisch induzierte Resistenzerscheinungen spielen bei dieser Pathogenitätsverschiebung sicherlich eine Rolle. TYZZER weist zuerst 1927 und 1929 darauf hin, daß beim Huhn verschiedene Coccidien-Arten vorkommen. Er betont 1932, daß deshalb der Sammelbegriff "Coccidiose" abzulehnen sei, den auch HILBRICH (75) nicht angewandt sehen möchte.

Das Huhn wird von neun Coccidien-Species befallen, folglich gibt es neun Coccidiosen, die sich durch mehr oder weniger ausgeprägte Krankheitserscheinungen auszeichnen. Außerdem besteht gegenüber den gebräuchlichen, zugelassenen Coccidiostatica und -therapeutica ein markanter Unterschied in der Empfindlichkeit sowohl bei den einzelnen Coccidien-Arten als auch bei den einzelnen Stämmen dieser Arten. Gute erregerspezifische Präparate stehen zur Verfügung.
(PETERSON et al., 152; JOYNER et al., 1o3; ROGERS et al., 175; HILBRICH, 75, 77; GREUEL, 58, 59; BALL und WARREN, 8, 9; BALL, 7; REID und BREWER, 161,162; EDGAR et al., 4o; KOUWENHOVEN, 1o9, 11o; MORRISON et al., 14o, 141; BOWIE und Mitarb., 24; ENGLE et al., 45; LONG und MILLARD, 125; STOCK et al., 192; MIERT und KOUWENHOVEN, 138; REHM und Mitarb., 16o; GREUEL und HILBRING, 57;)
Diese Tatsache und auch die Möglichkeit, daß es in der BRD einmal zur Anwendung der in den USA bereits im Einsatz befindlichen "Coccidien-Vaccinen" kommen könnte, machen es erforderlich, daß bei der Feststellung von Coccidioseausbrüchen besonderer Wert auf die Artendifferenzierung gelegt werden muß, worauf auch SIEGMANN (187) und

MIERT und KOUWENHOVEN (138) ausdrücklich hinweisen. Bei einer Coccidiose sind Behandlung und Prognose von der auslösenden Erregerart abhängig.

Das Schrifttum über die Diagnostik der Coccidien-Species und Coccidiosen des Huhnes ist sehr umfangreich und die beschriebenen Untersuchungsmethoden zur einwandfreien Identifizierung einer Eimeria-Art sind sehr material- und zeitaufwendig und von vielen Begleitfaktoren, auf die später eingegangen werden soll, abhängig. So ist es zentralen Untersuchungsstellen sowohl aus zeitlichen als auch aus personellen Gründen unmöglich, die täglich anfallenden Coccidienfälle nach der Erregerart zu differenzieren.

Herr Prof. Dr. FRITZSCHE stellte mir deshalb die Aufgabe, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, grössere Mengen von Untersuchungsmaterial in kürzerer Zeit ohne Einbussen an Genauigkeit der Diagnose zu bewältigen. Arbeits-, Zeit- und nach Möglichkeit auch Kostenaufwand sollen eingeschränkt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

Diagnostik der Coccidiosen

Bis zur Veröffentlichung von TYZZER's grundlegenden Arbeiten (2o8, 21o, 211, 212) über die Coccidiosen des Huhnes, über deren Spezifität und die Diagnostizierung verschiedener Arten, fasste man alle beim Huhn, Fasan, Rebhuhn, Pfau, sowie bei der Pute und Gans vorkommenden Coccidien unter der einen Species "EIMERIA AVIUM" zusammen. Unter dieser Bezeichnung verstand man aber besonders E. tenella, denn dieses Coccidium, bekannt als der Erreger der "Roten Kükenruhr" trat in dieser Zeit neben E. necatrix in erster Linie als krankheitserregender Parasit auf und verursachte ausser erheblichen Verlusten die auffälligsten Symptome.

TYZZER schlägt 1927 aufgrund seiner Beobachtungen und Untersuchungen vor, dass der Erreger der Roten Kükenruhr E. tenella benannt werden sollte und die damals scheinbar nicht krankmachenden Arten unter dem Sammelbegriff "Eimeria avium" zusammenzufassen wären. In seiner ersten zusammenfassenden Arbeit über die Kriterien und Methoden zur Diagnostik der Coccidien und Coccidiosen sagt TYZZER (2o8) folgendes:
"Es gibt so viele Arten von Coccidiosen wie es Coccidien gibt, jede mit ihren spezifischen Symptomen. Alle bekannten, beim Huhn vorkommen-

den Arten besiedeln den Verdauungskanal und dringen in dessen Zellen ein. Obwohl Coccidien weltweit verbreitet sind und nahezu bei allen Tiergruppen vorkommen, wird das Problem doch dadurch vereinfacht, daß diese Parasiten wirtsspezifisch sind. Das bedeutet, jede Art kommt nur in einer Wirtsart oder in einer begrenzten Gruppe eng verwandter Wirte vor. Hiervon aber scheint einer der optimale Wirt zu sein. Diese Vereinfachung des Problems der Identifizierung durch die strenge Wirtsspezifität ist auf der anderen Seite wiederum dadurch eingeschränkt und erschwert, daß ein Tier Hauptwirt mehrerer Arten sein kann."

Im Folgenden soll versucht werden, zunächst einen Überblick über das Arbeitsgebiet der Coccidiendiagnostik unter Berücksichtigung der vorliegenden Originalarbeiten zu geben.

Die derzeitige Coccidiendiagnostik ist aufgebaut auf der Bestimmung der Form und Größe der Oocysten und der vorausgehenden Entwicklungsstadien, der Beobachtung der klinischen Symptome, der Feststellung des Sitzes der Parasiten in bestimmten Darmabschnitten und Schichten der Darmwand, der Beschreibung der durch die Invasion hervorgerufenen pathologisch - anatomischen sowie -histologischen Veränderungen und schließlich auf der Beobachtung der biologischen Eigenschaften der Parasiten. Gestützt ist sie wesentlich auf die Arbeiten von TYZZER (208, 210, 211, 212); TYZZER, THEILER und JONES (209); JOHNSON (98) und HAASE (64). Übereinstimmend mit jenen Autoren schlagen REID (165), PELLÉRDY (150), POHL (156), SCHNEIDER (194) und HILBRICH (75) die gleichzeitige Anwendung mehrerer Techniken vor, um die charakteristischen Merkmale der einzelnen Species mosaikartig zu einem fertigen Bild zusammensetzen zu können. Die bisherigen diagnostischen Arbeitsmethoden sind gleichzeitig sowohl an den Parasiten als auch an seinen Wirt gebunden. Eine Bestimmung der Art ist mit den aufgeführten Untersuchungsmethoden unabhängig vom Wirtstier, mit Ausnahme von E. maxima, wegen der auffälligen Oocystengröße nicht möglich.

TYZZER (208, 211) fordert, da morphologisch keine exakt messbaren Differenzen bestehen, zur einwandfreien Identifizierung der Arten eine Untersuchung nach folgenden Gesichtspunkten:

1.) Größenmessung der Oocysten,
2.) Bestimmung der Sporulationsdauer der Oocysten,
3.) Beschreibung makroskopischer und mikroskopischer Veränderungen,

4.) Feststellung der Verbreitung und Lage der Parasiten im Darm und dessen Epithel, einzeln oder in Gruppen, oberflächlich oder tief, in Drüsen oder in anderen Gewebsschichten und der Bestimmung der Topographie der festzustellenden Veränderungen,
5.) Kreuzimmunitätsuntersuchungen und schließlich
6.) falls erforderlich, zusätzliche Testinvasionen von Tieren mit reinem Oocystenmaterial, gegebenenfalls mit nur einer Oocyste.

Untersuchungstechniken der verschiedenen naturwissenschaftlichen und medizinischen Disziplinen fanden so Eingang in die Diagnostik der Coccidiosen:
1) klinisch-diagnostische,
2) physikalische,
3) biologisch-physiologische,
4) deskriptiv pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische,
5) immunologische und
6) haematologische.
Diese Techniken sollen im folgenden Teil der Arbeit einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

1.) KLINISCHE DIAGNOSTIK
Die klinische Symptomatologie der Coccidiosen des Huhnes weist für die einzelnen Coccidien-Arten mit Ausnahme der E. tenella-Coccidiose kaum eine Spezifität auf. Sie hat lediglich im Hinblick auf den gesamten Krankheitskomplex eine gewisse Aussagekraft.

Pathognostische Symptome, wie bei der Blinddarmcoccidiose der blutige Durchfall, treten bei den übrigen Coccidiosen nicht so deutlich hervor; hier sind es vielmehr Krankheitserscheinungen und -bilder allgemeiner Natur, wie sie bei vielen anderen Erkrankungen gleichsam zu beobachten sind.

Kamm und übrige Kopfanhänge befallener Tiere werden blass und erschlaffen, die Köpfe werden lang, die Pigmentierung läßt nach; Durchfall bei gestörter Futteraufnahme und vermehrter Wasseraufnahme stellt sich ein; Wachstumsstörungen äußern sich in Gewichtsverlusten bis zur völligen Abmagerung, in deren Folge Todesfälle zu verzeichnen sind; Leistungsabfall ist nicht selten die augenfälligste Erscheinung; die Schlupffähigkeit von Eiern ist herabgesetzt. Stoffwechselstörungen bewirken

Verschiebungen des Blutbildes oder können neben Darmblutungen Ursache allgemeiner Anaemie sein. Diesem mehr chronischen Verlauf, hervorgerufen durch anhaltende Reinvasionen, stehen Coccidioseausbrüche gegenüber, in deren Folge vermehrt perakute Todesfälle eintreten.

Das Krankheitsbild der einzelnen Coccidiosen ist daher außerordentlich variabel, alle Übergänge zwischen den beiden beschriebenen Extremen werden beobachtet. Die klinische Untersuchung läßt einen Verdacht auf das Vorliegen einer Coccidiose zu, nicht aber die Diagnose der Art. Hierzu kann sie nur unterstützend herangezogen werden.

2.) PHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

TYZZER (207, 209, 210, 211), TYZZER et al.(209), HAASE (64), LEVINE (119, 120, 121), GILL (53), BECKER et al. (12,13, 14), EDGAR (42), REID (165), POHL(156) und HILBRICH (75) bedienen sich in der Diagnostik physikalischer Hilfsmittel. Sie bestimmen die Oocystengröße und die Ausmaße von Entwicklungsstadien mit Mikrometereinrichtungen. Gemessen werden Länge und Breite von mindestens 100 Objekten, damit ein einigermaßen sicherer Mittelwert erhalten wird. Durch Division der Längenmaße durch das der Breite der Oocysten errechneten BECKER et al. (14) den Formenindex, der ebenfalls zur Bestimmung herangezogen werden kann.

Größe und Form von Oocysten der neun beim Huhn vorkommenden Arten und sogar der einzelnen Stämme sind sehr variabel. Darüber hinaus besteht eine Abhängigkeit der Größe von exogenen Faktoren, wie der Ernährung, der Schwere und dem Stadium der Invasion. Leichtere Invasionen führen zur Bildung größerer Oocysten. Die in der Literatur beschriebenen Werte weisen für alle Arten, außer für Oocysten von E. maxima und die sehr großen Schizonten von E. necatrix, Uberschneidungen auf. Besonders bei dem Vorliegen von Mischinfestationen können diese Kriterien leicht Anlaß zu Fehldiagnosen geben. Daneben ist es der Zeitaufwand, der eine konsequente Durchführung dieser Methode nur selten zuläßt. Das genaue Ausmessen von mindestens 100 Exemplaren erfordert auch bei einiger Übung mehrere Stunden Arbeit. Darauf, daß die Methode der Größenbestimmung der Oocysten oder der Entwicklungsstadien allein keine diagnostische Aussagekraft hat, weist schon JONES (zit. nach TYZZER et al. 208) hin. Auch HILBRICH (75) fordert wie TYZZER (207, 210) die gleichzeitige Anwendung mehrerer Untersuchungsmethoden.

REID (165), POHL (156) und HILBRICH (75) geben übereinstimmend folgende Durchschnittsgrößen der Oocysten der einzelnen Arten in μ an. So mißt E. acervulina 18,3 x 14,6; E. brunetti 24,6 x 18,8; E. hagani 19,1 x 17,6; E. maxima 3o,5 x 2o,7; E. mivati 15,6 x 13,4; E. mitis 16,2 x 16,o; E. necatrix 2o,4 x 17,2; E.praecox 21,3 X 17,1 und E. tenella 22,o x 19,o. Schon bei diesen Mittelwerten fällt auf, daß sie bei E. acervulina, E. brunetti, E. hagani, E. mitis, E. necatrix, sowie E. tenella und E. praecox keine sehr auffälligen Abweichungen von einander aufweisen.

Unterzieht man schließlich noch die vom Mittelwert abweichenden extremen Meßwerte der einzelnen Species einer kritischen Betrachtung, so werden erhebliche Überschneidungen festgestellt.

So können beispielsweise E. acervulina - (extreme Länge: 17,7 - 2o,2; extreme Breite: 13,7 - 16,3), mit E. hagani - (extreme Länge: 15,8 - 2o,9; extreme Breite: 14,3 - 19,5), mit E. mivati - (extreme Länge: 11,1 - 19,9; extreme Breite: 1o,5 - 16,2), mit E. necatrix - (extreme Länge: 13,2 - 22,7; extreme Breite: 11,3 - 18,3) mit E. praecox - Oocysten (extreme Länge: 19,8 - 24,7; extreme Breite: 15,7 - 19,8) und darüber hinaus auch mit den Oocysten von E. tenella (extreme Länge: 19,5 - 26,o; extreme Breite: 16,5 - 22,8) verwechselt werden.

Nicht selten dürfte dieses auch mit den Oocysten von E. brunetti (extreme Länge: 2o,7 - 3o,3; extreme Breite: 18,1 - 24,2) der Fall sein.

3.) BIOLOGISCH-PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Die Praepatenzperiode, d.h. die Zeit von der Aufnahme invasionstüchtiger sporulierter Oocysten bis zur Ausscheidung neuer Oocysten, hervorgegangen aus der endogenen Entwicklungsphase, sowie die Sporulationszeit dieser Oocysten, wurden schon frühzeitig zur Unterscheidung der Coccidien des Huhnes herangezogen (TYZZER, 21o). Während die Praepatenzperiode für die einzelnen Arten relativ konstant und durch äußere Faktoren kaum beeinflußbar ist - nur geringe Abweichungen beschreibt EDGAR (42) - gilt dieses nicht für die Sporulationszeit. Diese begrenzt den Zeitraum der exogenen Entwicklungsphase, auch als Sporogonie bezeichnet. Die Dauer dieses Prozesses ist von verschiedenen Einflüssen abhängig und daher variabel.

Wärme, Feuchtigkeit und Sauerstoff begünstigen die Oocystenreifung und verkürzen deren Dauer. EDGAR (43) konnte bei + 29°C ± 1°C die schnellste und optimalste Sporulation von E. tenella - Oocysten feststellen, und diese Beobachtung (42) auch für die übrigen Coccidienarten des Huhnes und der Pute bestätigen. Als Sporulationsmedium dient im allgemeinen eine 2 oder 2,5 %ige wässrige Lösung von Kaliumbichromat. LÖTZE und LEEK (134) verwenden Leitungswasser, in das sie Sauerstoff aus einer Bombe unter ständigem Rühren einleiten. Die Sporulation ist erst dann abgeschlossen, wenn die Oocysten invasionstüchtig sind. Die bloße Sichtkontrolle durch mikroskopischen Nachweis der vier Sporocysten in der Oocyste genügt nicht. Durch Infestationsversuche konnte EDGAR (42) beweisen, daß sichtbar sporulierte Oocysten noch nicht invasionstüchtig zu sein brauchen.

Die Sporulationszeiten, die TYZZER (208, 210) für E. tenella und BECKER (15) für die übrigen Arten mitteilen, wurden bei Zimmertemperaturen gewonnen. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind auf die wechselnde Temperatur zurückzuführen. Durch eine konstante Temperatur von + 29°C ± 1°C konnte EDGAR (42, 43) die bis dahin allgemein angegebene Sporulationszeit von 48 h von E. tenella um mehr als die Hälfte, nämlich auf 18 h verkürzen. Die Ausnutzung der Sporogoniedauer für die Differenzierung der Coccidien ist nur dann möglich, wenn bei allen Untersuchungen gleichmäßig konstante Temperaturen eingehalten und das gleiche Milieu vorausgesetzt werden. Der Abschluß der Sporulation, gekennzeichnet durch die Invasionstüchtigkeit der Oocysten, kann nur durch Infestationsversuche ermittelt werden. Diese setzt gleichaltriges, empfängliches Tiermaterial für die Exaktheit der Untersuchung voraus. Bei einer konstanten Temperatur von + 29°C ± 1°C besteht jedoch mit Ausnahme für E. maxima mit 30 h Sporulationsdauer kein signifikanter Unterschied bei den übrigen Arten, die für ihre exogene Entwicklungsphase gleichsam 17 bis 18 h benötigen.

Den genauen Zeitpunkt des Sporulationsabschlusses festzustellen, stößt so auf erhebliche Schwierigkeiten, laufende Kontrollen sind erforderlich. Die Schwierigkeiten werden bei dem Vorliegen von Mischinvasionen noch erhöht; hierbei ist es häufig unmöglich festzustellen, welche der vorliegenden Arten zuerst sporulierte. Abgesehen hiervon gelangen häufig perakute Coccidiosen mit Todesfolge zur Untersuchung, bei denen keine sporulationsfähigen Oocysten vorhanden sind.

4.) DESKRIPTIV PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE UND PATHOLOGISCH-HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Die Pathogenese der Coccidiosen als echte Parasitosen ist von endogenen Faktoren abhäging und durch exogene Einflüsse zu verändern. Coccidiosen sind daher wie alle Erkrankungen biologischen Gesetzmäßigkeiten unterworfen, von denen bekannt ist, daß sie durch ein hohes Maß an Variabilität ausgezeichnet sind. Das Bild der pathologisch-anatomischen Veränderungen kann sich vom bloßen Coccidienbefall ohne sichtbare Läsionen der Darmschleimhaut bis zur vollständigen Zerstörung derselben erstrekken. Unter gewissen, gleichmäßigen Voraussetzungen sind die hervorgerufenen Veränderungen für die einzelnen Arten jedoch einigermaßen pathognostisch und können eine erhebliche diagnostische Hilfe sein.

Der makroskopischen- und mikroskopisch-histologischen Arbeitsmethoden der Pathologie hat man sich in der Coccidiendiagnostik schon frühzeitig bedient (ROSENCRANTZ, 184; TYZZER, 2o8, 21o, 211, 212; TYZZER et al. 2o9). Die genauere Untersuchung der Lage der parasitären Stadien in der Darmwand, einzeln oder in Gruppen, oberflächlich oder tief, im Epithel oberhalb oder unterhalb des Zellkernes, in der Drüsenschicht der Submucosa oder Muscularis, nehmen TYZZER (2o8), TYZZER et al. (2o9) und HILBRICH (75) mit Hilfe histologischer Methoden vor. Die Schwierigkeit, parasitische Stadien von Coccidien im Gewebe färberisch darzustellen, konnte durch die Arbeiten von WAGNER und FOERSTER (214) überwunden werden. Neben der besonders guten Darstellung von Sporozoiten, die sich frei im Darmlumen oder bereits in der Darmschleimhaut befinden, eignet sich die von den Autoren entwickelte Methode auch befriedigend zum Nachweis der Schizogoniestadien. Spezialfärbungen zur Darstellung von Coccidien werden vorher nicht angegeben. Bei den meisten Untersuchern war die Haematoxylin-Eosin-Färbung, die Eisenhaematoxylinfärbung nach Heidenhain und vereinzelt auch die Giemsafärbung gebräuchlich. SCHULEMANN und WURMBACH (2o6) geben für die Färbung von Protozoen eine modifizierte Giemsafärbung an, die SCHOLTYSECK (2o4) besonders geeignet für den Nachweis von Coccidien-Jugendstadien hält.

Die PAS - Reaktion (periodic-acid- Schiff reaction, Mc MANUS (137); HOTCHKISS (91), sowie die kombinierte PAS - Feulgenreaktion von AFIFI und ACARA (1) hat zunächst PATTILLO (149) herangezogen und bereits vereinzelt Gegenfärbungen mit verschiedenen Farbstoffen, wie Orange G,

Lichtgrün und Haematoxilin nach Delafield benutzt. Diese Methode erleichtert durch Anfärben des Glycogens in den Sporozoiten das Auffinden derselben. Diese Gegenfärbungen bei der PAS-Methode untersuchten WAGNER und FOERSTER (214) näher und fanden, daß ein Farbstoffgemisch von Anilinblau und Orange G für diesen Zweck optimal geeignet zu sein scheint. Diese von ihnen entwickelte Methode, die PAS-AO-Färbung, ist heute in der Coccidiendiagnostik gebräuchlich und hat nach den Erfahrungen der Autoren den Vorteil, daß zur eigentlichen Kernplasmafärbung die Anfärbung von Glycogen durch das PAS-Verfahren kommt.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von SCHOLTYSECK und WEISSENFELS (196); SCHOLTYSECK (199, 200, 201) und SCHOLTYSECK und VOIGT (197) dienen weniger diagnostischen Zwecken, als der Aufklärung der Feinstruktur von Coccidienoocysten und verschiedenen Entwicklungsstufen, sowie der engen wechselseitigen Beziehungen zwischen Wirtszellen und Parasit.

Die pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen werden bei den einzelnen Coccidiosen durch unterschiedliche Entwicklungsstufen hervorgerufen. Bei E. tenella und E. necatrix sind es z. B. die Schizonten, bei E. adenoeides der Pute, die Gameten. Die mit dem unbewaffneten Auge wahrnehmbaren Veränderungen, die die einzelnen Coccidien-Species hervorrufen, sind einerseits die makroskopisch erkennbaren pathologisch -anatomischen Schäden der Darmschleimhaut und andererseits die topographische Lage der Coccidiose-Veränderungen in den verschiedenen Darmabschnitten.

Relativ konstant bei natürlichem peroralem Invasionsweg ist der Siedlungsort der einzelnen Coccidienarten, wodurch eine Unterteilung in Dünndarm-, Mitteldarm-, Enddarm-, und Blinddarmcoccidiosen ermöglicht wird. Wird jedoch der Infestationsmodus künstlich abgeändert (IKEDA, 92; HORTON-SMITH und LONG, 80, 81 und LONG 126, 127), so zeigt es sich, daß für einzelne Arten eine Entwicklung in anderen Darmabschnitten, wie auch in embryonierten Hühnereiern möglich ist. Abgesehen von den Überlappungen des Siedlungsortes, besonders bei den Dünndarmcoccidien, ist sowohl die natürliche Invasionstopographie, als auch das Vermögen, sich bei abgeändertem Invasionsmodus in anderen Darmabschnitten oder Geweben entwickeln zu können, diagnostisch auswertbar. So ist es z. B. möglich, E. maxima und E. acervulina dadurch von den übrigen Arten abzutrennen,

daß sie sich nicht in embryonierten Hühnereiern entwickeln können (LONG, 126, 127). E. necatrix und E. brunetti können sich, wenn ihre Sporozoiten künstlich in den Blinddarm gegeben werden, im Gegensatz zu den anderen Dünndarmcoccidien in diesem entwickeln (HORTON-SMITH und LONG, 8o, 81).

Als der wichtigste endogene Faktor ist die Immunitätslage des Wirtstieres anzusehen. Diese ist in ihrer Stärke abhängig von der Zahl und Schwere vorausgegangener Coccidieninvasionen. TYZZER (211) unterscheidet zwei Grade, eine Teilimmunität, die sich als Folge schwächerer Invasionen einstellt und eine sterile Immunität, hervorgerufen durch wiederholte schwere Invasionen. Wenn auch unter natürlichen Bedingungen der sterile Immunitätsgrad sehr selten oder nie erreicht wird, so dürften die Übergänge zwischen beiden Formen fließend sein. Daß sich die Immunitätslage des Wirtstieres auf die durch Coccidien hervorgerufenen pathologisch- anatomischen und -histologischen Veränderungen auswirkt, betonen TYZZER (21o, 211); JANKIEWICZ (96); FARR (48); HORTON-SMITH (88, 89); BRACKETT und BLIZNICK (25); WACHENDÖRFER (213, 214); KEMLER und REID (1o6); SIEGMANN und POHL (188); HORTON-SMITH, LONG und PIERCE (184) sowie GREUEL (58, 59).

Die häufig zitierte Altersresistenz der Hühner gegen Coccidiosen (HERRICK, OTT und HOLMES (74), bei der es sich um eine erworbene Immunität infolge vorausgegangener Invasionen handelt (HORTON-SMITH, 89), wirkt sich so in ähnlicher Weise auf das Krankheitsgeschehen aus.

Auch die exogenen Faktoren, die das Bild der pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen variieren, müssen an dieser Stelle berücksichtigt werden.

Welchen signifikanten Einfluß Ca^{++}- Ionen in der Futterration auf den Verlauf und die Schwere der Coccidiosen ausüben, erkannten schon HOLMES, HERRICK und OTT (79). ZUCKER (22o, 221) führt dieses Phänomen auf die durch Ca^{++} gesteigerte Trypsinaktivität zurück, wodurch eine schnellere und stärkere Excystierung der Oocysten erfolgen soll. Diese Vermutung konnte von BRITTON et al. (27); HOFFMANN, MARKENSCHLAGER und ZUCKER (78); HABEDANK (65) und WEBER (217) bewiesen werden. Die gegenteilige Wirkung von rohem, trypsininhibitorhaltigem Sojaschrot konnte RIEDEL (172) aufzeigen.

Verlauf, Schwere und Ausgang der Coccidiosen sind darüber hinaus von weiteren Futterkomponenten abhängig. HAASE (164) betont den hemmenden Einfluß vegetabliler, rohfaserreicher und eiweißarmer Fütterung; die stärkere Ausprägung der Coccidiosen durch eiweißreiches Futter beobachteten BRITTON und Mitarb. (127).

Der günstige Einfluß des Vitamin A auf den Verlauf der Coccidiosen wird von vielen Autoren nachdrücklich betont (ALLEN, 2; SEIFRIED, 185; SCHOOP, WAGNER und MINNERS, 2o5; WACHENDÖRFER, 214; GYLSTORFF, 163; ERASMUS, 146; PELLÉRDY, 151 und GERRIETS, 51, 52). Primärer Vitamin A-Mangel spielt bei den heutigen Haltungs- und Fütterungsmethoden keine erhebliche Rolle mehr, auswirken kann sich jedoch ein unterschiedlich großes Leberdepot. Wie die Untersuchungen von ERASMUS (46) zeigen, wird dieses im Verlauf der Coccidiosen angegriffen. Als "Epithelschutz-Vitamin" oder "Epithel-Erhaltungsvitamin" schützt das Vitamin A vor bakteriellen Sekundärinfektionen. Degenerative Zellschäden der Darmschleimhaut verursachen Resorptionsstörungen und bedingen, wie die Untersuchungen von SEIFRIED (185) zeigen, einen circulus vitiosus. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich bei BOCH und BRONCH (22).

Die im Futter enthaltenen Coccidiostatica können den Verlauf der Coccidiosen sowohl direkt als auch indirekt beeinflussen: direkt dadurch, daß sie als Therapeutica in der Lage sind, den Entwicklungskreislauf der Coccidien zu unterbrechen oder zu hemmen; indirekt dadurch, daß verschiedene heute z.T. nicht mehr zugelassene Ciccidiostatica in das Immunitätsgeschehen eingreifen, indem sie die Ausbildung einer Immunität hemmen oder vollständig unterbinden (REID, 168, 169, 17o; KEMLER und REID, 1o6; REID und MURPHY, 163; GREUEL und HILBRING, 57).

Die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Stämme einzelner Coccidienspecies, die vom schwachen Coccidienbefall bis zur Coccidiose mit Todesfolge reichen kann, ist bekannt (SIEGMANN und POHL, 188; HARTWIGK und FEHLBERG, 7o).

Die Dosis der aufgenommenen oder künstlich applizierten Oocysten kann sich schließlich in zweierlei Hinsicht auswirken. Geringe Oocystenmengen rufen kaum makroskopisch sichtbare Veränderungen hervor, verändern aber das Bild nachfolgender stärkerer Invasionen

durch Ausbildung einer artabhängig schwächeren oder stärkeren Immunität. Die Läsionen, wie auch die Immunität, nehmen an Stärke mit der Dosis zu. (JANKIEWICZ, 96; BRACKETT, 26; HORTON-SMITH, 86; SIEGMANN und POHL, 188 und HARTWIGK und FEHLBERG, 70.)

Häufig auftretende Mischinvasionen besonders von E. acervulina mit E. maxima, E. mivati oder auch E. brunetti ändern nicht selten das gesamte Sektionsbild grundlegend, insofern als der gesamte Darmkanal mit Ausnahme der Blinddärme befallen sein kann, wodurch eine Auswertung der pathologisch-anatomischen Veränderungen unmöglich gemacht wird.

Bakterielle Sekundärinfektionen der durch Coccidien verursachten Läsionen mit Salmonellen oder Clostridien können zusätzlich die Spezifität derselben aufheben (JOHANSSON und SARLES, 97).

Schließlich ist bei verendet zum Versand gekommenen Hühnern, die meistens Zersetzungserscheinungen des Darmes zeigen, eine diagnostische Beurteilung der durch Coccidien hervorgerufenen pathologisch-anatomischen und nicht selten auch -histologischen Veränderungen unmöglich.

Die durch die einzelnen Coccidien-Species verursachten pathologisch-anatomischen Veränderungen unterliegen demnach keiner klaren Gesetzmäßigkeit. Sie sind vielmehr aufgrund zahlreicher Einflüsse, die endo- oder exogenen Ursprungs sein können, durch ein hohes Maß an Variabilität gekennzeichnet. Die hervorgerufenen Läsionen können nur bedingt als artspezifisch angesprochen werden.

5.) IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Kreuzimmunitätsuntersuchungen, wie TYZZER (208, 211) und TYZZER und Mitarb. (209) sie zur Diagnosestellung bei den Coccidiosen des Huhnes fordern, fanden besonders in einigen Großraumuntersuchungen Anwendung. So konnten KEMLER und REID (106); REID (166) und REID und Mitarb. (164) aufgrund dieser Untersuchungsmethode ermitteln, wie groß die Verbreitung von E. maxima und E. necatrix unter den Broilerbeständen in Georgia (USA) und die von E. mivati in westeuropäischen Hühnerbeständen ist.

Auf das Phänomen, das diesen Untersuchungen zugrunde liegt, soll im weiteren Verlauf der Arbeit noch ausführlicher eingegangen werden.

An dieser Stelle sei zunächst nur soviel gesagt, daß die Immunität im Anschluß an Coccidiosen beim Huhn mit geringen Einschränkungen artspezifisch ist. Testinfestationen mit den entsprechenden Coccidien-Species lassen erkennen, ob der Organismus sich bereits vorher mit einer analogen Invasion auseinandergesetzt hat.

Diese Art der Diagnosestellung findet besonders beim Einzeltier kaum Anwendung.

6.) HAEMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Anhand von klinischen Testen gelang es zunächst WAXLER (216) und später GREVEN (161), ein Absinken des Haematokritwertes bei Hühnern festzustellen, die mit Coccidien infestiert waren. Eine Änderung dieses Wertes war von vornherein besonders bei den Coccidioseformen zu erwarten, die mit Darmblutungen einhergehen, wie es z.B. bei E. tenella-, E. necatrix- und auch E. brunetti-Coccidiosen der Fall ist.

Diese Beobachtung fand ihre Bestätigung durch die Arbeiten von ROSENBERG und HERRICK (183), NATT und HERRICK (144), NATT (143) sowie JOYNER und DAVIES (104), die entweder den Haematokritwert oder den Haemoglobingehalt ermittelten. Verschiebungen im weißen Blutbild wies NATT (142) nach. Der Versuch von LÖLIGER und SCHUBERT (133), den diagnostischen Anwendungsbereich des Haematokritwertes besonders bei Coccidiosen und anderen Erkrankungen des Huhnes zu prüfen, erbrachte kein befriedigendes Ergebnis. Die Schwankungen der gefundenen Werte waren zu groß und außerdem zeigten diese keinerlei Spezifität für die untersuchten Erkrankungen. Weitere klinisch meßbare Reaktionen des Huhnes wie Abbau des Blutzuckers und der Glycogenreserven, Änderung des intermediären Stoffwechsels mit dadurch bedingtem Absinken der Körpertemperatur und Herabsetzung der Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur untersuchten PRATT (157, 158), LEVINE (177) und LEVINE und HERRICK (118).

Alle Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen zu wenig Spezifität auf,

um in der Diagnostik der Coccidiosen oder gar bei der Typendifferenzierung der einzelnen Arten Anwendung zu finden.

III. BIOLOGIE DER ERREGER

Durch die gleichzeitige Anwendung der oben beschriebenen Untersuchungsmethoden war es möglich, den Entwicklungskreislauf dieser Protozoengattung "Eimeria" aufzuklären und bisher neun beim Huhn vorkommende Arten durch mosaikartige Zusammenfügung ihrer Charakteristika zu differenzieren.

Es sind dies folgende:

1) Eimeria tenella (Railliet und Lucet, 1891),
2) Eimeria necatrix (Johnson, 193o),
3) Eimeria maxima (Tyzzer, 1929),
4) Eimeria acervulina (Tyzzer, 1929),
5) Eimeria mivati (Edgar und Siebold, 1964),
6) Eimeria brunetti (Levine, 1942),
7) Eimeria mitis (Tyzzer, 1929),
8) Eimeria hagani (Levine, 1938) und
9) Eimeria praecox (Johnson, 193o).

Der Entwicklungskreislauf gilt mit geringen Abweichungen für alle beim Huhn vorkommenden Species. Im Gegensatz zu anderen Protozoen ist die Gattung "Eimeria" einwirtig. Die endogene Entwicklung, die sich in eine ungeschlechtliche und eine geschlechtliche Phase aufteilt, läuft in chronologischer Folge in Darmzellen des Wirtes ab, während die exogene Entwicklung, nicht an einen Zwischenwirt gebunden, sich im Freien anschließt.

A. Endogene Entwicklung:

I. Agamogonie: (Schizogonie) (Merogonie)

Acht Sporozoiten schlüpfen aus den vier Sporocysten, die in einer reifen Oocyste enthalten sind, wenn diese von einem Huhn aufgenommen wird.

Der einzelne Sporozoit reift zum Schizonten (Meronten) heran und erzeugt durch Vielfachteilung zahlreiche Merozoiten, die erneut Darmzellen befallen. Dieser Vorgang wiederholt sich artabhängig 1-2mal oder auch häufiger.

Die Schizonten der letzten Generation leiten die

II. Gametogonie: ein, indem sie sich von Mikro- und Makrogametozyten zu beweglichen Mikrogameten und unbeweglichen Makrogameten differenzieren.

Der männliche Mikrogamet befruchtet den weiblichen Makrogameten, es entsteht die Zygote, die als Oocyste mit dem Kot ausgeschieden wird.

B. Exogene Entwicklung:

I. Sporogonie: In der Außenwelt rollt sich der Sporoblast unter Zutritt von Sauerstoff kugelförmig zusammen und teilt sich dann in vier Sporocysten, in denen durch weitere Kernteilung je zwei Sporozoiten gebildet werden. Als Dauerform enthält so die reife Oocyste vier Sporocysten mit je zwei Sporozoiten. Deutliche Oocysten- oder Sporocystenrestkörper evtl. auch ein Stiedae-Körperchen, wie sie für die Coccidien des Kaninchens spezifisch sind, werden nicht beobachtet. Die Oocystenwand ist doppelt konturiert und gelegentlich mit einer Mikropyle versehen.

Eine Beschreibung der einzelnen Arten, sowie der durch diese hervorgerufenen pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen soll an dieser Stelle nicht wiederholt werden; es soll nur auf das umfangreiche Schrifttum hingewiesen werden.
(BECKER, 15; BERTKE, 19; BOLES und BECKER, 23; CHALLEY und BURNS, 31; CLARK et al., 34; DAVIES, 36, 37; DOORNINK, van und BECKER, 38; EDGAR, 44; EDGAR und SIEBOLD, 41; GREVEN, 61; HILBRICH, 74, 75; HORTON-SMITH, 86, 87; HORTON-SMITH und LONG, 82; JOHNSON, 98; KREMER, 112; LEVINE, 119, 12o, 121; LONG, 122, 123, 124, 132; PATTILLO, 148; REID, 165; ROSENCRANTZ, 184; SUPPERER, 19o; SCHNEIDER, 194; SCHNEIDER und HAAS, 193, 195; SCHOLTYSECK, 198, 199, 2oo, 2o1, 2o2, 2o3, 2o4, SCHOLTYSECK und WEISSENFELS, 196; TYZZER, 2o8, 21o, 211, 212; TYZZER et al. 2o9)

Die Studien dieser Autoren sind in den nachfolgend aufgeführten Werken zusammenfassend dargestellt:

" Coccidiosis" by DAVIES, JOYNER and KENDALL (135);

"Coccidia and Coccidiosis" by PELLÉRDY (15o);

"Disease of Poultry" by BIESTER and SCHWARTE (2o);

"Lehrbuch der Geflügelkrankheiten" von FRITZSCHE und GERRIETS (5o);

sowie in dem Lehrbuch

"Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten" von GRATZL und KÖHLER (56).

IV. IMMUNOLOGIE DER COCCIDIOSEN:

Während die immunisierende Eigenschaft von Bakterien schon frühzeitig empirisch erkannt wurde, konnte der Nachweis derselben für Parasiten erst relativ spät erbracht werden.

ISAAK und van den FELDEN (94) sowie FLECKSEDER und van STEJSKAL (5oa) dürften die ersten gewesen sein, die die immunisierende Kraft von Parasiten nachwiesen. Sie fanden beim Menschen präzipitierende Antikörper gegen Diphylobothrium latum und Taenita spp. .

Ebenso wie bei Infektionen mit Mikroorganismen beantwortet der betroffene Wirt eine parasitäre Invasion oder den Kontakt mit Parasiten, die Fremdprotein darstellen oder solches während ihres Stoffwechsels bilden mit einer Immunreaktion. Dieses Phänomen kann als die wichtigste Manifestierung des Wirt- Parasit- Verhältnisses gedeutet werden (KENT, 1o8; SOULSBY, 189).

HALL und WIGDOR (66) waren vermutlich die ersten Autoren, die von der erfolgreichen Immunisierung eines Hundes durch eine Coccidieninvasion berichten. ANDREWS (3) konnte das Ergebnis dieser Untersuchung dadurch bestätigen, daß er bei Hunden und Katzen eine bis zu sieben Monaten anhaltende Immunität nach überstandener Infestation mit Coccidien nachweisen konnte.

Daß auch die Coccidien im Huhn gewisse Schutzmechanismen im Verlauf einer Invasion auslösen, zeigte sich zunächst bei den Untersuchungen von JOHNSON (1o2), der diese Erscheinung bei Küken anfänglich als eine Altersresistenz ansah, aber schon in einer früheren Arbeit (1o1) vermutete, daß nicht das Alter der entscheidende Faktor dieser Resistenz sei. JOHNSON selbst konnte den experimentellen Beweis für seine Vermutung erbringen. Nachdem BEACH und CORL (1o) durch ihre

Experimente die Richtigkeit seiner Annahme erkannt hatten, stellte er 1927 bei Küken, an die er sporulierte Oocysten von E. tenella verfüttert hatte, eine belastbare Teilimmunität fest.

Die nachfolgenden Arbeiten, die sich intensiv mit dem Immunitätsproblem der Coccidiosen beim Huhn befassen, sind zunächst die von TYZZER (2o9, 21o) und TYZZER und Mitarb. (2o8). Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte die Erkenntnis von dem Immunisierungsvermögen der Coccidien auch auf die zu diesem Zeitpunkt bereits bekannten Species übertragen werden. LEVINE (12o, 121) und EDGAR und SIEBOLD (41) konnten dieses Verhalten auch bei den von ihnen entdeckten Arten wie E. necatrix, E. praecox, E. hagani, E. brunetti und E. mivati nachweisen.

Die Frage, ob die Immunität nach Invasionen mit Coccidien als eine Praemunität oder als eine echte Immunität anzusehen ist, wurde klar entschieden. Die Immunität nach überstandenen Invasionen mit Coccidien ist eine echte Immunität (ROSE, 179).

MOREHOUSE (139), TYZZER et al. (2o9) sowie HORTON-SMITH (89) u. a. konnten experimentell beweisen, daß die Immunität gegen Reinfestationen mit Coccidien durch die fortwährende Aufnahme dieser Protozoen bedingt ist. Immunität kann bei den Coccidiosen nicht durch parasitische Stadien aufrecht erhalten werden, da diese den Darm im Anschluß an die Invasion verlassen. Die Coccidiosen sind selbstheilende Erkrankungen, bedingt durch begrenzten Entwicklungszyklus der Erreger.

Die experimentelle sowie die natürliche Belastbarkeit dieser Immunität ist abhängig von der Größe des Inokulums, das sie hervorrief. Darüber hinaus ist das Immunisierungsvermögen der einzelnen Species unterschiedlich.

Auf das direkte Abhängigkeitsverhältnis des Immunitätsgrades von der Anzahl der aufgenommenen bzw. verabreichten sporulierten Oocysten weist als erster TYZZER (211) hin. Nach der Verabfolgung ganz geringer Oocystenmengen von E. tenella an sechs Tage alte Küken stellte er keine belastbare Immunität fest. JOHNSON (99) und HORTON-SMITH (89) konnten zeigen, daß mit der Zahl der verabreichten Oocysten der Immunitätsgrad wächst.

Daß die immunisierende Kraft der einzelnen Coccidienarten des Huhnes unterschiedlich ist, versucht TYZZER (21o, 211) durch die unterschiedliche Pathogenität derselben zu erklären. Eimeria-Arten, deren Entwicklungsstadien tief in die Darmwand eindringen wie z.B. E. tenella und E. necatrix sollen hiernach in kurzer Zeit eine solide Immunität erzeugen. Abweichend hiervon stellten dagegen ROSE und LONG (18o) fest, daß E. maxima, gemessen an ihrer immunisierenden Wirksamkeit, vor den o.a. Species einzureihen ist; es folgt an zweiter Stelle E. acervulina und dann erst E. tenella und E. necatrix. Diese Einteilung leiten die Autoren aus der folgenden Überlegung ab:
Die Entwicklung der Coccidien in teilimmunen Tieren ist nicht vollständig unterdrückt, die Zahl der ausgeschiedenen Oocysten bei der Belastungsprobe muß entsprechend der immunisierenden Kraft der Arten reduziert sein. Da die Menge der ausgeschiedenen Oocysten sich naturgemäß nach der Zahl der aufgenommenen richtet, setzen die Autoren beide Zahlen zu einander in Beziehung und benennen den Quotienten aus den Zahlen der aufgenommenen und ausgeschiedenen Oocysten den R e p r o d u k t i v e n I n d e x (R.I.). In den anschließenden Untersuchungen wies E. maxima in der 7 Tage nach der Erstinfestation durchgeführten Belastungsprobe den kleinsten R.I. auf.

Die sehr bedeutsame Feststellung von TYZZER (2o8, 21o), TYZZER und Mitarb. (2o9) und ROSE und LONG (18o), daß die Immunität, die als Folgeerscheinung einer überstandenen Erkrankung an Coccidiose auftritt, streng spezifisch und selektiv für die einzelnen beim Huhn auftretenden Arten ist, erfuhr erst 1967 durch die Untersuchung von ROSE (177, 178) eine Einschränkung.

TYZZER (2o8) und TYZZER und Mitarb. (2o9) konnten beobachten, daß Küken, die eine E. tenella-Coccidiose überstanden hatten, an einer E. acervulina- und E. maxima-Coccidiose erkrankten, wenn sie Oocysten dieser Species erhielten. LEVINE (121) konnte Küken nicht gegen E. necatrix durch eine E. tenella-Invasion schützen. Diese selektive Immunität wurde auch bei den später entdeckten Arten nachgewiesen und gilt heute noch in der Species-Diagnose als das beweiskräftigste Kriterium.

ROSE (177,178) leitet nun neuerdings aus ihren Versuchen ab, daß

die Eigenschaft der selektiven Immunität bei E. brunetti und E. maxima sowie bei E. necatrix und E. tenella nicht uneingeschränkt vorausgesetzt werden darf. So schieden gegen E. tenella immune Tiere nach einer Testinfestation mit E. necatrix nur etwa halb soviele Oocysten dieser Art aus, wie die nicht immunen Kontrollen. Der Versuch erwies sich als reversibel. Wiederholte Inokulationen von E. necatrix-Merozoiten direkt in die Blinddärme vermochten jedoch nicht die Oocystenproduktion zu reduzieren, die als Folge einer anschließenden Verabreichung von E. tenella-Merozoiten in die Blinddärme folgte. Gegen E. maxima immunisierte Küken sollen ebenfalls bei einer Belastungsprobe mit E. brunetti-Oocysten eine meßbare Verringerung der ausgeschiedenen Oocysten gegenüber den Kontrollen gezeigt haben. Nach ROSE (177, 178) muß bei diesen vier Arten mit einer partiellen Kreuzimmunität gerechnet werden.

Die aufgezeigten, ausgewählten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Immunität im Anschluß an Coccidiosen heute allgemein anerkannt wird (ROSE, 179).

Die Frage, welche Entwicklungsstadien während der endogenen Phase im Huhn als Antigen wirksam sind und Immunität des Wirtsorganismus nach überstandener Invasion hervorrufen, ist dagegen vielfältigen Untersuchungen zum Trotz noch nicht zur Zufriedenheit beantwortet. Völlig ungeklärt ist ebenfalls der Wirkungsmechanismus der Immunreaktion des Huhnes gegenüber Coccidiosen.

Einzelne Immunisierungsversuche mit verschiedenen Entwicklungsstadien zur Beantwortung der Frage, welche Stadien der Coccidien als Antigen wirken und Immunität des Wirtstieres hervorrufen, wurden durchgeführt.

Aus ihren Untersuchungen mit E. tenella leiten KENDALL und Mc CULLOUGH (1o7) ab, daß es in der Hauptsache die Schizonten II sind, die für den Immunitätseintritt verantwortlich zu machen sind. Bei Erstinfestationen, so stellten sie fest, beginnt die Immunität nach 72 h und hat mit 95 h ihren Höhepunkt erreicht. Innerhalb dieser Zeitspanne setzt sich der Wirtsorganismus mit den Schizon-

ten II auseinander. Medikamente, die die frühen Schizontenstadien in ihrer Entwicklung hemmen, verhindern die Ausbildung der Immunität. (HORTON-SMITH und TAYLOR, 9o; HORTON-SMITH et al. 83). Dieses Ergebnis wird von den Autoren ebenfalls dahingehend gedeutet, daß die zweite Schizontengeneration für die Auslösung einer Immunreaktion verantwotlich zu machen ist. Gegen die Richtigkeit dieser Meinung spricht, daß es ROSE (178) nicht gelang, bei Küken durch die alleinige Verabreichung von Merozoiten II, den Vorstadien der Schizonten II von E. tenella und E. necatrix eine Immunität hervorzurufen.

Die sexuellen Generationen besitzen nach RIPSOM und HERRICK (173) im Entwicklungszyklus keine immunogenen Eigenschaften. SCHOLTYSECK (2o3) weist jedoch während der Gametogonie auf eine Zellveränderung hin, die er als Immunreaktion im Stadium der Erstinvasion ansieht. Während der Gametogonie beantwortet nämlich der Wirtsorganismus das Eindringen von Gamonten in die Zelle mit einer Hypertrophie derselben. Diese Zellvergrößerung deutete bereits WEISSENBERG (218) als Xenon-Bildung. Diese verhindert, daß durch das Wachstum des Parasiten die Zelle zerstört wird. SCHOLTYSECK (2o3) sieht in dieser Reaktion insofern eine Immunreaktion, als die Zelle die Fähigkeit hierzu zunächst erlernen müsse. ROSE (178) gelang es dagegen, nicht, Küken gegen E. tenella und E.necatrix zu immunisieren, wenn ausschließlich Gameten dieser beiden Arten zur Infestation verwendet wurden. Gehemmt wird aber die Weiterentwicklung der Gametozyten von E. tenella, wenn diese an immune Küken verfüttert werden. (HORTON-SMITH und Mitarb., 84).

Auch die Sporozoiten scheinen im Immunitätsgeschehen der Coccidiosen eine gewisse Rolle zu spielen. Während die meisten der nachträglich aufgeführten Autoren darin übereinstimmen,daß die Excystierung der Sporozoiten in dem immunen Wirt analog der im nicht immunen Huhn abläuft, gehen die Auffassungen über das weitere Schicksal dieses Entwicklungsstadiums auseinander. MOREHOUSE (139) konnte keine Penetration der Sporozoiten von E. nieschulzi in das Darmepithel immuner Ratten beobachten. HAMMOND und Mitarb. (69) teilen zunächst mit, daß die Weiterentwicklung der Sporozoiten von E. bovis in immunisierten Kälbern nicht gehemmt wird, sondern daß die Hemmung nur die Gametozyten betrifft. Später (HAMMOND und Mitarb. 67, 68) stellen sie auch eine Blockierung von Schizonten fest.

Andere Forscher, die Untersuchungen mit den Eimerien des Huhnes (TYZZER, et al., 2o9; HORTON-SMITH und Mitarb., 84; LEATHEM, 116; LEATHEM und BURNS, 115) und der Puten (AUGUSTIN und RIDGES, 4) durchführten, konnten übereinstimmend die Penetration in die Darmschleimhaut immuner Tiere feststellen. Eine Weiterentwicklung derselben war nicht zu beobachten. Während Sporozoiten, die in das Darmepithel immuner Küken eingedrungen sind, nach 24 h noch invasionstüchtig sind, ist bereits nach 48 h eine vollständige Inaktivierung erfolgt (LEATHEM und BURNS, 115). Später tritt die vollständige Lysis dieser Stadien ein (HORTON-SMITH, LONG und PIERCE, 84). ROSE (176) glaubt aus der Komplexheit des Entwicklungsganges der Coccidien ableiten zu können, daß eine spezifische Immunität des Wirtes gegen einzelne Entwicklungsstadien gebildet werden könnte.Infestationen mit Gamonten von E. tenella immunisierten nur gegen Sekundärinvasionen mit Gamonten, nicht aber gegen Schizonten.

Keine der aufgeführten Arbeiten vermochte einen schlüssigen Beweis zu erbringen, daß nur dieses oder jenes Entwicklungsstadium verantwortlich für die Ausbildung einer Immunisierung des Wirtstieres ist. Es hat sich aber gezeigt, daß von der Immunreaktion die unterschiedlichsten Entwicklungsformen betroffen werden, wodurch diese eine Hemmung in ihrer Weiterentwicklung erfahren.

Die einzelnen Entwicklungsstadien der Coccidien stellen jeweils nur ein Glied in der Kette der Auseinandersetzung zwischen Wirt und Parasit dar. Sie können daher auch im Immunitätsgeschehen kaum isoliert betrachtet werden; dieses gibt auch KRÜGER (113) zu bedenken.

V. UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER UND SEROLOGISCHER REAKTIONEN IM ANSCHLUSS AN COCCIDIOSEN:

KAGAN (1o5) betont, daß grundsätzlich zwischen serologischen und immunologischen Reaktionen eines Organismus unterschieden werden muß. Setzt sich ein Organismus mit einem Antigen auseinander, so kann er dieses Geschehen mit Reaktionen beantworten, die mit den herkömmlichen Methoden zum Nachweis serologischer Reaktionen sicht-

bar gemacht werden können. Stellen diese serologischen Reaktionen zugleich immunologische Reaktionen dar, so fordert KAGAN für diese den Nachweis von drei Kriterien. 1. Die Reaktionen müssen mit herkömmlichen Methoden nachweisbar sein. 2. Die Absorption der Serum-Antikörper muß mit dem Antigen vollständig gelingen. 3. Die Möglichkeit der passiven Immunisierung anderer Organismen mit diesem Serum muß gegeben sein.

Beide Reaktionen, serologische und auch immunologische können unabhängig von einander auftreten. Dieses scheint bei den Coccidien nach den meisten bisher vorliegenden Untersuchungen der Fall zu sein.

Serologische Reaktionen als Folgeerscheinung einer Coccidieninvasion versuchten zunächst BLUMENTHAL (21), KUCZYNSKI (114), PATERSON (147), CHAPMAN (32) und BACHMAN (5) nachzuweisen. Alle Untersuchungen dieser Autoren verliefen ohne Ergebnis, BLUMENTHAL und KUCZYNSKI machten E. stiedae-Infektionen des Kaninchens für positive Wassermann-Reaktionen verantwortlich. MARKUSE (135) und TORRES (2o7) konnten jedoch nachweisen, daß zwischen dieser Reaktion und der Coccidiose kein Zusammenhang bestand. PATEPSON, CHAPMAN und BACHMAN versuchten mit Hilfe der Komplementbindung zirkulierende Antikörper beim Kaninchen nachzuweisen. PATERSON (147) extrahierte Lebern befallener Tiere mit Kochsalz- und Karbollösungen sowie mit Alkohol. Diese Extrakte dienten ihm als Antigen. CHAPMAN (32), die mit E. perforans des Kaninchens arbeitete, gewann Antigen aus zerstörten und getrockneten Oocysten, bzw. mit Hilfe von Phenol-, Kochsalz- oder Alkoholextrakten aus befallenen Darmteilen. BACHMAN (5) testete ebenfalls ergebnislos Seren von stark mit E. stiedae befallenen Kaninchen.Ihm dienten als Antigen Alkohol-, Aether- und Kochsalzextrakte von Lebern dieser Tiere. Mc DERMOTT und STAUBER (136), ITAGAKI und TSUBOKURA (95) und HERLICH (73) wiesen schließlich Agglutinine im Serum von Hühnern nach. Präzipitine konnte zunächst ROSE (182) im Serum von Kaninchen demonstrieren. Der Nachweis gelang anschließend ROSE und LONG (18o), PIERCE, LONG und HORTON-SMITH (155), BURNS und CHALLEY (28) im Serum von Hühnern und RIDGES (171) und AUGUSTIN und RIDGES (4) im Serum von Puten. Das Auftreten von Lysinen beobachteten LONG, ROSE und PIERCE (13o), BURNS und CHALLEY (28) im Serum von Hühnern. Komplementbindende

Antikörper wies ROSE (181) im Serum von Kaninchen nach und schließlich konnte ČERNÁ (3o) Antikörper in Kaninchenseren mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörper-Reaktion nachweisen. Der Nachweis dieser Reaktionen erfolgte jeweils im Anschluß an Coccidieninvasionen oder nach einer künstlich durchgeführten Immunisierung.

Die serologische Reaktion im Anschluß an eine natürlich abgelaufene Coccidiose ist nicht gleichzeitig immunologischer Natur. Die passive Übertragbarkeit der Immunität mit Serum auf einen anderen Organismus gelang TYZZER (211), BACHMAN (5), BECKER et al. (17, 18), BECKER (16), ROSE (182), LONG und Mitarb. (131), AUGUSTIN und RIDGES (4), PIERCE et al. (154) und FITZGERALD (49) nicht. Wird jedoch der Invasionsweg modifiziert - LONG und ROSE (131) infestierten z.B. Küken auf intravenösem Weg mit E. tenella - Sporozoiten - so zeigen sich diese Tiere gegenüber Testinvasionen, die mit den gleichen Stadien intravenös vorgenommen werden, immun. Diese Reaktion stellt eine Immunreaktion dar. Sie ist passiv übertragbar, verleiht aber gegen gleichzeitig peroral durchgeführte Invasionen keine Immunität. Der Nachweis dieser serologischen Reaktionen und die immunologischen Beobachtungen, die in dem entsprechenden Abschnitt beschrieben werden, zeigen, daß Coccidien ein antigenes Verhalten zeigen. Allen Untersuchungen zum Trotz ist die Frage nach der Art des Abwehrmechanismus bei Coccidiosen bisher unbeantwortet geblieben. Im allgemeinen nimmt man eine gewebsgebundene, sessile Immunreaktion des Darmgewebes an. Thymus und Bursa fabricii haben bei den Coccidiosen keinen Einfluß auf die Immunreaktion (PIERCE und LONG, 153), ihr Fehlen unterbindet aber das Auftreten von serologischen Reaktionen (LONG und PIERCE, 129). Keine Erklärung fand man bisher für die Beobachtung von BURNS und CHALLEY (29) und HORTON-SMITH et al. (85) bei der E. tenella- und der E. necatrix-Coccidiose. Die Immunreaktion dieser Coccidiosen schützte bei Reinfestationen auch die Blinddärme, die während den Infestationen zur Immunisierung ligiert worden waren.

1.) AGGLUTININE:

Mc DERMOTT und STAUBER versuchten 1954 zu klären, ob die Merozoiten II von E. tenella ein antigenes Verhalten zeigen. Sie stellten zu diesem Zweck eine Suspension dieser Entwicklungsstadien her, indem

Hühnern 5 Tage nach einer Infestation mit E. tenella-Oocysten die Blinddärme entnommen wurden. Der Inhalt wurde herausgewaschen und die Schleimhaut leicht abgeschabt. Nach kurzem Homogenisieren und Trypsinieren bei Zimmertemperatur wurde das Material häufig in physiologischer Kochsalzlösung, der Formalin zugesetzt war, gewaschen. Die so gewonnene Merozoiten-Suspension wurde Kaninchen und Hühnern nach einem nicht näher beschriebenen Schema und in einer nicht angegebenen Menge injiziert. Die erhaltenen Antiseren agglutinierten Merozoiten II von E. tenella bis zu einer Serumverdünnung von 1:32o.

Ebenfalls dem Nachweis von Agglutininen waren die Versuche von ITAGAKI und TSUBOKURA (95) gewidmet. Merozoiten II in E. tenella wurden ebenfalls am 5. Tage p.i. durch Entnahme des Blinddarminhaltes gewonnen, der mehrmals gewaschen wurde. Der Bodensatz wurde im Verhältnis 1:1o in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, der o,5% Formalin zugesetzt war. Mit diesem Antigen wurden Kaninchen nach einem nicht angegebenen Schema immunisiert. Antiserum wurde 3o min auf 56° C erhitzt und durch Zugabe von Phenol stabilisiert. Es wurden Objektträger- und Röhrchen-Agglutinationsteste in einer geometrischen Serum-Verdünnungsreihe von 1:3, 1:6, 1:12 usw. bei Zimmertemperatur (23° C) und im Brutschrank bei 37° C angesetzt. Bei der Objektträger-Methode wurden je ein Tropfen Antigen mit einem Tropfen Serum-Verdünnung gemischt, während im Röhrchen- Test zu o.3 ml Antigen o.3 ml Serum-Verdünnung gegeben wurden. Die Ergebnisse der Objektträger-Methode stimmten mit denen des Röhrchen-Testes überein. Agglutinationen der Merozoiten konnten in einer Serum-Verdünnung von 1:96 bis 1:768 innerhalb einer Minute festgestellt werden. Die Verfasser werten die erzielte Agglutinationsreaktion als eine spezifische Antigen- Antikörperreaktion, da die Agglutination nach einer Erhitzung der Seren auf 75° C nicht mehr auftrat. Gleichzeitig geben die Autoren aber zu bedenken, daß länger aufbewahrte Suspensionen von Merozoiten zur spontanen Agglutination neigen. Darüber hinaus trat auch in den negativen Serumkontrollen bis zu einer Verdünnung von 1:24 innerhalb von 3 bis 5 min Agglutination auf, die bei 37° C noch beschleunigt wurde. Als eine besondere Schwierigkeit hat sich

bei diesen Untersuchungen die Immunisierung der Kaninchen herausgestellt. Die meisten der Versuchstiere starben, wenn die Antigendosis 1.o bis 1.5 ml überschritt.

Agglutination von Merozoiten II von E. tenella und E. acervulina sah ebenfalls HERLICH (73). In seinen Versuchen von 1965, auf die an anderer Stelle noch näher eingegangen wird, konnte er dagegen keine Agglutinationsreaktionen beobachten. BURNS und CHALLEY (28) stellten Agglutinationen der Merozoiten von E. tenella nur gelegentlich fest. Hierbei trat die Reaktion sporadisch sowohl in Antiseren, die auf ihren Gehalt an Lysinen untersucht wurden, wie auch in den negativen Serumkontrollen auf. Keine Agglutinationsreaktionen sahen LONG, ROSE und PIERCE und AUGUSTIN und RIDGES bei ihren Versuchen von 1963.

2.) PRÄZIPITINE:

Der Nachweis präzipitierender Antikörper gelang zunächst ROSE (182) im Serum von Kaninchen nach überstandener E. stiedae-Coccidiose oder nach künstlicher Immunisierung mit Antigen-Extrakten derselben Art im Ouchterlony-Diffusionstest.

Daß entsprechende Antikörper auch im Serum von Hühnern und Puten im Anschluß an die E. tenella-, E. necatrix-, E. acervulina- und E. maxima-Coccidiose des Huhnes und der E. meleagrimitis-Coccidiose der Pute auftreten, konnten ROSE und LONG (18o), PIERCE, LONG und HORTON-SMITH (155), RIDGES (171), AUGUSTIN und RIDGES (4) sowie BURNS und CHALLEY (28) demonstrieren. Die Veröffentlichung von HORTON-SMITH und LONG (83) stellt eine Zusammenfassung der Arbeiten dieser Autoren von 1961 und 1962 dar.

In ihren Experimenten zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern im Serum von Kaninchen nach überstandener E. stiedae-Coccidiose oder künstlicher Immunisierung mit entsprechenden Antigen-Extrakten untersuchte ROSE (182) zwei Antigene.

Das eine der Antigene war Gallengangsexsudat, das gegen Ende der Praepatenzperiode dieser Erkrankung vermehrt in den Gallengängen befallener Lebern austritt. Der klare Überstand dieser Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren fand Verwendung. Das andere der Antigene

wurde aus zerstörten, nicht versporten Oocysten gewonnen. Diese wurden durch wiederholtes schnelles Einfrieren und Zerquetschen im Glasmörser im Volumenverhältnis 1:1o in physiologischer Lösung verdünnt und anschließend sofort 5 min bei 2ooo Upm zentrifugiert. Auch hier diente der Überstand als Antigen. Positive Seren stammten von Kaninchen, die peroral mit E. stiedae-Oocysten oder durch subcutane Injektionen mit Gallengangsexsudat, mit oder ohne Zusatz von Aluminiumhydroxid, immunisiert wurden. Je 2 ml Exsudat oder Vaccine wurden 3-mal im Abstand von 5 und 7 Tagen s.c. injiziert. 19 Tage nach der letzten Injektion wurden nochmals 6 ml gegeben. Nach Ablauf von 14 Tagen erfolgte die Serumgewinnung.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:
Alle Antiseren präzipitierten sowohl das Gallengangs- als auch das Oocysten-Antigen. Am stärksten präzipitierten die Seren der künstlich mit der Aluminiumhydroxid-Vaccine immunisierten Kaninchen. Der Titer dieser Seren konnte durch eine angeschlossene perorale Infestation mit sporulierten Oocysten noch erhöht werden. Am schwächsten erwies sich die Reaktion der Seren von Kaninchen, die ausschließlich mit dem Gallengangsexsudat ohne einen Zusatz von Adjuvans immunisiert worden waren. Bei Kaninchen, die auf peroralem Weg infestiert wurden, traten am 11ten Tag p.i. die ersten Präzipitine im Serum auf.

Die Zahl der Präzipitationsbanden in der Agar-Gel-Diffusionsmethode nach OUCHTERLONY (145, 146) schwankten zwischen drei bei den peroral und sechs bei den durch s.c. Injektionen immunisierten Kaninchen. Serum und Antigen wurden i.d.R. 3-mal nachgefüllt. Mindestens drei der mit beiden Antigenen erzielten Banden waren nach den Angaben von ROSE identisch.

Der Nachweis von Präzipitinen im Serum von Küken, die peroral mit E. tenella- und E. necatrix-Oocysten, sowie s.c., i.v. oder i.a. mit Antigen-Extrakten dieser Arten immunisiert worden waren, gelang TYZZER und Mitarb. (2o9) nicht.

Erst PIERCE, LONG und HORTON-SMITH (155) konnten das Auftreten präzipitierender Antikörper im Serum von Junghennen im Anschluß an die E. tenella-Coccidiose beweisen. Küken im Alter von 7 bzw. 14 Tagen

wurden im wöchentlichen Abstand mit 5.oo, 5.ooo und 5o.ooo E. tenella-Oocysten infestiert. Ein Challenge erfolgte 14 Tage nach der letzten Infestation mit 1oo.ooo Oocysten. Einige Tiere wurden zusätzlich zur peroralen Dosis mit einem Antigen-Extrakt aus Schizonten II immunisiert. Die Injektionen erfolgten i.m., das Schema der Immunisierung wird nicht näher beschrieben.

Als Antigen fanden ein Extrakt aus Schizonten II sowie aus Oocysten der Species E. tenella Anwendung.

Zur Antigengewinnung wurden die Caeca am 5ten Tag p.i. entnommen. Der Inhalt wurde zunächst gründlich mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) ausgewaschen. Anschließend wurden die Blinddärme mit den in der Schleimhaut sitzenden Schizonten in einer Verdünnung von 1:2 in PBS homogenisiert. Das Homogenat wurde 6-mal schnell eingefroren und aufgetaut, danach 3o min bei 13.ooo Upm zentrifugiert. Der Überstand, der 1.42 mg N_2 /1 ml enthielt, diente als Antigen. Zur Herstellung des Oocysten-Extraktes beschallte man 22.5 x $1o^6$ sporulierte E. tenella-Oocysten 15 bis 3o min im Eisbad. Durch diese Behandlung sollen die meisten Oocysten- und Sporocystenwände aufgerissen worden sein. Anschließend wurde ebenfalls bei 13.ooo Upm zentrifugiert. Der Überstand, der 2.o5 mg N_2 /1 ml enthielt, diente als zweites Antigen. Die Verfasser betonen, daß das Oocysten-Antigen schwerer mit einer wirkungsvollen Eiweißkonzentration zu gewinnen sei, und daß die Art der Herstellung die Gefahr einer bakteriellen Verunreinigung bedinge.

Die Präzipitationsuntersuchungen wurden im Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (145, 146) durchgeführt. 1.5%iger Agar mit einer Kochsalzkonzentration von 8% und einem pH-Wert von 7.4 diente als Medium.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:
Nicht alle Seren der Versuchstiere zeigten Präzipitationsreaktionen. Die Präzipitation des Oocysten-Antigens erfolgte schwächer als die des Schizonten-Antigens. Gewöhnlich wurde eine Bande beobachtet, wenn die Seren der peroral immunisierten Tiere gegen beide Antigenarten diffundierten. Gelegentlich wurden aber bis zu drei Banden festgestellt.

Eine zusätzliche Bande präzipitierte das Serum der peroral und intramuskulär immunisierten Küken. Diese Bande blieb auch nach der Absorption mit einem Extrakt aus nicht infiziertem Blinddarmgewebe bestehen. Die Präzipitationsbanden, die mit den unterschiedlichen Antigenen erzielt wurden, waren identisch. Um die Spezifität der Reaktionen zu prüfen, wurde zusätzlich ein E. stiedae-Antigen, bestehend aus Gallengangsexsudat eingesetzt. Das Serum des zusätzlich durch i.m. Injektionen immunisierten Tieres ergab mit diesem Antigen eine Kreuzreaktion.

Der Nachweis präzipitierender Antikörper im Serum von Junghennen nach überstandener E. tenella-Coccidiose, den PIERCE et al. (155) geführt hatte, wurde durch die Untersuchung von ROSE und LONG (18o) auf weitere Coccidiosen des Huhnes wie die E. acervulina-, die E. maxima- und die E. necatrix-Coccidiose ausgedehnt. Gleichzeitig wurde die E. tenella-Coccidiose nochmals in den Versuch einbezogen.

Zur Immunisierung wurden Küken mit Beginn der 3ten Lebenswoche zum erstenmal infestiert. Zwei bis drei Reinfestationen folgten in wöchentlichem Abstand, beginnend mit dem 38ten Tag nach der ersten Invasion. Der Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (145, 146) wurde in einem 1.5%igen Agar mit 8% Kochsalz bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Bezüglich der Herstellung der Antigene aus den vier Coccidien-Arten werden in der Aufzeichnung keine Angaben gemacht. Es wird vermutet, daß man bei der Gewinnung ähnlich wie in der Untersuchung von PIERCE und Mitarb. (155) verfuhr.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:
In allen Seren der immunisierten Tiere wurden, individuelle, graduelle Unterschiede eingeschlossen, Präzipitine nachgewiesen, die spezifisch mit dem jeweils zur Immunisierung verwendeten Antigen reagierten. Die schwächsten Reaktionen zeigten die Seren mit E. necatrix-Oocysten immunisierter Tiere. Im Vergleich zu den drei anderen Arten, die i.d.R. zwei deutliche Banden präzipitierten, war es bei dieser nur eine schwache.

Im Alter von 4 1/2 Monaten, 1o7 Tage nach Beginn der Immunisierung, wurden folgende Kreuzungsinfestationen durchgeführt. Die gegen

E. acervulina-Coccidiose immunisierten Tiere wurden mit E. maxima- und E. necatrix-Oocysten, die gegen E. tenella-Coccidiose immunisierten Hühner mit E. necatrix-Oocysten, die gegen E. necatrix-Coccidiose immunisierten Hühner mit E. tenella-Oocysten und die gegen E. maxima-Coccidiose immunisierten Tiere mit E. acervulina- und E. necatrix-Oocysten infestiert.

Mit Ausnahme der Seren von Tieren, die zunächst gegen E. tenella-Coccidiose immunisiert und mit E. necatrix-Oocysten reinfestiert worden waren, präzipitierten alle Seren nun ausschließlich Antigenextrakte, die aus den bei der Reinvasion eingesetzten Species gewonnen worden waren. Nur die Seren der primär gegen die E. tenella-Coccidiose immunen Tiere präzipitierten im Anschluß an die Reinfestation sowohl das E. tenella- als auch das E. necatrix-Antigen. Diese Kreuzreaktion konnte jedoch nicht bei dem Serum der primär gegen die E. necatrix-Coccidiose und anschließend gegen die E. tenella-Coccidiose immunisierten Hühner beobachtet werden. Die Verfasser deuten diese Kreuzreaktion dahingehend, daß die Antigenstruktur von E. tenella und E. necatrix nahe verwandt sein müssen. Bestünde diese Antigenverwandtschaft, müßte die Reaktion auf der einen Seite reversibel sein, auf der anderen Seite geht aber nicht aus der Veröffentlichung hervor, ob eine Prüfung vorgenommen wurde, die die Anwesenheit von Präzipitinen gegen E. tenella-Coccidiose vor Beginn der Immunisierung gegen die E. necatrix-Coccidiose ausschließt. Von der E. tenella-Coccidiose ist bekannt, daß die im Anschluß auftretende Immunität von langer Dauer ist.

Weitere Präzipitationsreaktionen sahen RIDGES (171) und AUGUSTIN und RIDGES (4) im Anschluß an die E. meleagrimitis-Coccidiose der Puten sowohl im Agar-Gel-Diffusionstest, als auch an einzelnen Entwicklungsstadien dieser Species.

Präzipitinhaltige Seren stammten von Puten, die eine E. meleagrimitis-Coccidiose überstanden hatten. Zunächst wurde die Wirkung dieser Seren auf freie Merozoiten III geprüft. Folgende Ansätze wurden gemacht: 1) Merozoiten III und physiologische Kochsalzlösung, 2) Merozoiten III und Immunserum (komplementhaltig), 3) Merozoiten III und Immunserum (erhitzt auf 56° C zur Zerstörung des Komplements), 4) Merozoiten III

und normales komplementhaltiges Putenserum und 5) Merozoiten III und normales Putenserum (erhitzt auf 56° C zur Zerstörung des Komplements). Die Einwirkungszeit betrug 1 h bei 37° C. Neben den im nächsten Abschnitt zu beschreibenden Lysisreaktionen wurde folgendes beobachtet: Während an den Merozoiten, auf die das nicht erhitzte Antiserum einwirkte, nur Lysisreaktionen eintraten, wurde der Inhalt der Merozoiten, die in dem positiven Serum mit zerstörtem Komplement inkubiert wurden, präzipitiert. Zusätzlich trat eine kleine Ausstülpung von Präzipitat am spitzen Pol der Merozoitenhülle in Form eines Schwanzes aus. Dieser Erscheinung ging eine Abnahme der Motilität der Parasiten voraus. Die Merozoiten in der physiologischen Kochsalzlösung und in dem erhitzten negativen Putenserum blieben während der Einwirkungszeit unverändert. Lysis trat aber in den negativen, nicht erhitzten Seren auf. Ein vergleichbares Auftreten von Präzipitaten an der Parasitenoberfläche oder im Inneren von Entwicklungsstadien beobachteten weder Mc DERMOTT und STAUBER (136), ITAGAKI und TSUBOKURA (95), HERLICH (72, 73), LONG und Mitarb.(130), AUGUSTIN und RIDGES (4) noch BURNS und CHALLEY (28) bei ähnlichen Untersuchungen.

Zur Durchführung von Agar-Gel-Diffusionstesten wurde ein Antigen-Extrakt aus befallener Darmwand und aus Oocysten hergestellt. Sporozoiten enthaltende Darmwand wurde nach dem Auswaschen des Darminhaltes zerschnitten und in physiologischer Kochsalzlösung, der 0.1 % HCL zugesetzt war, im Volumenverhältnis 1:5 extrahiert. Nach sofortigem Zentrifugieren wurde der Extrakt durch Dialyse konzentriert. Nähere Angaben hierzu fehlen. Außerdem wurde die Extraktion von Oocysten, die durch Ultraschall zerstört wurden, versucht. Eine ausführliche Beschreibung der verfolgten Technik fehlt auch hier.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:
Die Immunseren von Puten präzipitierten den Darm-Parasiten-Antigen-Extrakt in zwei oder mehr Banden, wovon eine Bande deutlicher hervortrat. Da Extrakte von nicht befallener Darmwand diese Bande nicht aufwiesen, wurde diese dem Parasitenantigen zugesprochen. Sämtliche Versuche mit dem Oocysten-Extrakt als Antigen verliefen ergebnislos. Dieses wird von den Verfassern auf die kurze Verweildauer der Oocysten und der darin enthaltenen Sporozoiten zurückgeführt, obwohl mit Darmextrakten, die

Sporozoiten enthalten hatten, Präzipitationsreaktionen erzielt wurden. Außerdem konnten Kaninchen nach einem nicht aufgeführten Schema mit Extrakten aus einer Sporozoiten enthaltenden Darmwand immunisiert werden. Die Immunseren dieser Kaninchen präzipitierten das verwendete Antigen in zahlreichen Banden, so daß es Schwierigkeiten bereitete, die spezifische Bande, in der das Parasiten-Antigen präzipitiert war, herauszufinden. Eine deutlichere Bande soll mit der oben bereits hervorgehobenen identisch sein und nach Angaben der Verfasser eine spezifische Antigen- Antikörperreaktion zwischen Immunserum und dem Parasiten-Antigen darstellen.

3. LYSINE:

Bei den Untersuchungen zur Beantwortung der Frage, ob in dem Serum von Geflügel Lysine im Anschluß an Coccidiosen auftreten, wurden einander widersprechende Ergebnisse erzielt.

LONG, ROSE und PIERCE (13o) konnten Lysisreaktionen an Sporozoiten und Merozoiten II von E. tenella feststellen, wenn folgende Versuchsanordnung gewählt wurde. Antiseren von Junghennen in einer Verdünnungsreihe von 1:3 bis 1:24 ließ man in Gegenwart von zwei Komplement-Arten 1 h bei 37° C auf E. tenella- Sporozoiten und Merozoiten II einwirken. Das Komplement der positiven Seren wurde zwar durch Erhitzen auf 56° C über 3o min zerstört. Als Komplement (K') diente frisches Hühnerserum von Tieren, die nicht an Coccidiose erkrankt gewesen waren. Das Komplement (K") war handelsübliches Meerschweinchenkomplement. Die eintretenden Lysisreaktionen wurden durch Inaktivierung des Serums aufgehoben, bei der Zugabe von Komplement (K") trat in den Serumverdünnungen 1:6 und 1:12 erneut Lysis auf. Komplement (K") allein lysierte die zur Prüfung herangezogenen Entwicklungsstadien. Negative, nicht komplementhaltige Seren bewirkten keine Lysis, doch traten Formveränderungen bei Sporozoiten von der normalen Sichel- zu mehr abgerundeter Form auf und die Invasionstüchtigkeit derselben war anschließend herabgesetzt. Im allgemeinen traten Lysine und Präzipitine gleichzeitig auf. Einige Seren bewirkten jedoch Lysis, ohne daß die Gegenwart von Präzipitinen nachgewiesen werden konnte.

Lysisreaktionen an Sporozoiten sowie Merozoiten II von E. tenella konnten auch BURNS und CHALLEY (28) in unverdünnten Seren von infestierten Hühnern

zeigen. Der Lysistest wurde in Röhrchen durchgeführt, in denen bei dauerndem Schütteln o,5 ml Immunserum und ca. o.5 x $1o^6$ Merozoiten oder Sporozoiten bei 37° C inkubiert wurden. Lysisreaktionen traten sehr schnell ein. Die Lysis von Merozoiten soll nach wenigen Minuten eingesetzt haben. Die Reaktion begann durch schnelle Abnahme der Motilität, es folgten Formveränderungen, Vakuolisierung des Zellinhaltes. Schließlich blieb nur die leere Zellmembran als "ghost" übrig. Der gesamte Vorgang soll 1o min in Anspruch genommen haben. Sporozoiten wurden im Gegensatz zu Merozoiten in den negativen Serumkontrollen lysiert. Die Verdünnung des Serums auf 1:3 hob diese Reaktion auf.In Antiseren wurde Lysis auch bei einer Serumverdünnung von 1:3 festgestellt.

Lysisreaktionen konnten AUGUSTIN und RIDGES (4) bei ihren Untersuchungen zum Nachweis von Präzipitinen im Anschluß an die E. meleagrimitis-Coccidiose der Puten ebenfalls beobachten. Die Verfasser halten dieses Reaktion jedoch nicht für eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion, da Lysis auch in normalem, komplementhaltigem Putenserum eintrat.

Im Widerspruch hierzu stehen wieder die Beobachtungen von HERLICH (72), der keine Lysis von E. tenella- und E. acervulina-Sporozoiten und Merozoiten II sah, wenn er diese Entwicklungsstadien in unverdünnten, komplementhaltigen Immunseren bei 37° C für 2 h inkubierte. Lediglich eine Abnahme der Beweglichkeit konnte in den homologen Seren verzeichnet werden und die untersuchten Entwicklungsstadien hatten ihre Invasionstüchtigkeit verloren. Organismen blieben in den negativen Kontrollen unverändert.

4. KOMPLEMENTBINDE ANTIKÖRPER:

Zum Nachweis von komplementbindenden Antikörpern in Seren von Kaninchen, als Ausdruck einer überstandenen E.stiedae-Coccidiose oder nach künstlicher Sensibilisierung mit Antigenextrakten, untersucht ROSE (181) die gleichen Seren und Antigene, die auch bei ihren Versuchen von 1959 zum Nachweis von Präzipitinen Anwendung gefunden hatten. Es wurde die 5o%-Endpunkt-Technik verfolgt, mit der folgende Ergebnisse erzielt wurden:

Die KBR erwies sich als sensibler als die Agar-Gel-Präzipitation.

Der Titer erreichte gegen den 22ten Tag p.i. ein Maximum , blieb etwa 2o Tage auf dieser Höhe stehen und nahm dann langsam ab. Komplementbindende Antikörper waren bis zu 16o Tagen p.i. nachweisbar, während Präzipitine nur etwa bis 6o Tage p.i. im Serum auftraten.

Den höchsten Titer (132) wies das Serum des durch s.c. Injektionen mit einer Aluminiumhydroxid-Vaccine und anschließend durch perorale Infestation immunisierten Kaninchens auf. (Die Herstellung der Vaccine und das Immunisierungsschema wurden bereits in der Arbeit von ROSE (182) erwähnt.) Die Titer der übrigen Seren lagen zwischen 8o und 12o. Die niedrigsten Werte wurden gefunden, wenn der Oocysten-Extrakt als Antigen Verwendung fand. Auch diese Ergebnisse stimmen mit jenen überein, die ROSE (182) bei ihren Versuchen zum Nachweis von Präzipitinen im Serum von Kaninchen erzielte.

4. FLUORESZENZSEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN:

Mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörperreaktion versuchte CERNA (3o) bei Kaninchen Antikörper gegen E. magna zu demonstrieren. Antiseren stammten von 6 Wochen alten, stark mit E. magna infestierten Kaninchen.

Gametocyten und Oocysten dienten als Antigen. Hierzu wurden parasitenhaltige Darmteile entnommen und nach der Methode von WOLMAN-BEHAR (1952) fixiert. Anschließend wurde in Paraffin eingebettet und 4 - 5 µ dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger fixiert, über Xylol, 96%igen Alkohol und 7o%igen Alkohol für 2o min in destilliertes Wasser überführt und danach in PBS 2o min gewaschen. Das unverdünnte Kaninchenserum wurde auf die Schnitte aufgetragen. Die Einwirkungszeit betrug 45 min bei Zimmertemperatur (18-2o° C) in der feuchten Kammer. Nach einem Aufenthalt von 15 min in fließendem Wasser und 5 min in Aqua dest. wurden die mit Fluoreszein-Isothiozyanat konjugierten Antikörper (Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin) in einer Verdünnung 1:4 aufgetragen und für ebenfalls 45 min unter gleichen Bedingungen auf dem Präparat belassen. Abschließend wurden die Schnitte wieder in fließendem Wasser und Aqua dest. gespült, in gepuffertem Glyzerin eingeschlossen und im Fluoreszenzmikroskop durchgesehen.

Auf Objektträger fixierte Oocysten, die aus dem Kot ausgewaschen

wurden, wurden in gleicher Weise behandelt.

Die besten Ergebnisse sollen mit Makrogametocyten erzielt worden sein, bei denen der sog. "Kranzeffekt", den DALLENBACH und PIEKARSKI (34a) bei den Toxoplasmen sahen, auftrat. Bei den Mikrogametocyten war die Fluoreszenz schwächer, der Kranzeffekt wurde nicht beobachtet. Gleiche Versuche mit negativen Kontrollseren verliefen ergebnislos.

Ein Versuch, die vielfältigen serologischen Reaktionen, die als Folgereaktion einer Coccidiose auftreten, für diagnostische Zwecke auszuwerten, ist bisher unterblieben.

Die beim Huhn und Kaninchen durchgeführten serologischen Untersuchungen dienten der Aufklärung des Immunitätsmechanismus dieser Parasitosen. Keine der vorliegenden Arbeiten wurde dahingehend ausgewertet, ob die nachweisbaren serologischen Reaktionen als diagnostische Hilfsmittel Anwendung finden können.

VI. EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

Nach dem Studium des Schrifttums über das Coccidioseproblem wird der Untersuchung folgende Arbeitshypothese vorangestellt:
Überstandene Coccidiosen oder die Auseinandersetzung mit Coccidien-Antigenen rufen beim Huhn immunologische und serologische Reaktionen hervor. Diese Reaktionen sind mit wenigen Ausnahmen für die neun beim Huhn auftretenden Coccidien-Arten streng spezifisch.

Daraus wird gefolgert, daß die Antigenstruktur einzelner oder aller Entwicklungsstadien der Coccidien-Species des Huhnes unterschiedlich sein könnte.

Es soll daher der Inhalt der vorliegenden Untersuchungen sein, zu klären, ob bei der Eimeria-Art E. acervulina des Huhnes Antigene vorliegen, die mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörperreaktion im Folgenden "IFAR" genannt, dargestellt werden können. Die Spezifität evtl. auftretender serologischer Reaktionen soll gleichzeitig in dem Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (145, 146), in der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) und in der "IFAR" an E. stiedae - Antigen aus einem Coccidium des Kaninchens geprüft

werden, das von PIERCE, LONG und HORTON-SMITH (155) in ihren Versuchen ebenfalls als Kontrollantigen gedient hatte.

Nachdem GOLDMAN (55) bei seinen Untersuchungen an Entamoeba histolytica (Rhizopode) zum ersten Mal die Immunofluoreszenz in der Parasitologie demonstrieren konnte, wurden auch erfolgreiche Untersuchungen mit den übrigen Protozoen, wie Flagellaten (ESSENFELD und FENNEL, 47), Sporozoen (INGRAM, OTKEN und JUMPER, 93; ČERNÁ, 3o) und an Ziliaten (BEALE und KACSER, 11) sowie mit Toxoplasmen, die unter den Protozoen eine unsichere Stellung einnehmen, durchgeführt (GOLDMAN, 54; KRAMAR et al., 111).

Viele erfolgreiche Versuche folgten diesen ersten Nachweisen.

MATERIAL UND UNTERSUCHUNGSMETHODEN

1) Versuchstiere:
Die Vermehrung des E. acervulina-Stammes erfolgte über HNL-Junghennen, die vom Eintagsküken an auf Drahtfußböden gehalten wurden.
In den Immunisierungsversuchen wurden männl., 4 Mon. alte Meerschweinchen und männl. und weibl., 6 Mon. alte Hauskaninchen eingesetzt.
Alle Versuchstiere wurden während der Versuchsdauer in Batterien gehalten, normal gefüttert und getränkt.

2) Eimeria-Stämme:
Der E. stiedae-Stamm wurde von Herrn Dr. U. DÜRR (Gießen) zur Verfügung gestellt. Ihm sei an dieser Stelle herzlich gedankt.
Der E. acervulina-Stamm wurde selbst aus einer Junghenne isoliert und nach den Kriterien, die LONG (124), HILBRICH (75) und SCHNEIDER (194) für diese Art angeben, bestimmt.

3) Oocystenanreicherung und -reinigung:
Zur Anreicherung der E. acervulina-Oocysten wurden die HNL-Junghennen infestiert, nachdem diese zuvor durch eine Kotanreicherung als coccidienfrei befunden wurden. Am Ende des 5ten Tages wurden die Tiere getötet. Der Darminhalt wurde ausgespült und die Schleimhaut des Dünndarmes bis zum Meckelschen Divertikel abgeschabt. Darminhalt und -schleimhaut wurden in Leitungswasser (25° C) aufgeschwemmt und mit einem Rührstab homogenisiert. Ca. o,5% Kaliumbichromat wurde zur Abtötung der Keim-

flora zugesetzt. Die Sporulation erfolgte in 5 l - Behältnissen bei Zimmertemperatur. Häufiges Umrühren und Aufwirbeln sorgte für ausreichende O_2 - Zufuhr. Die Sporulationsrate war ebenso hoch wie sie mit den allgemein üblichen Verfahren erzielt wird.
Gereinigt wurden die sporulierten E. acervulina - und E. stiedae-Oocysten nach der Methode von STEINHAGEN (191), die es ermöglicht, eine nahezu reine Suspension von sporulierten Oocysten ohne Fremdpartikel darzustellen (s. Abb. 1 und 2).

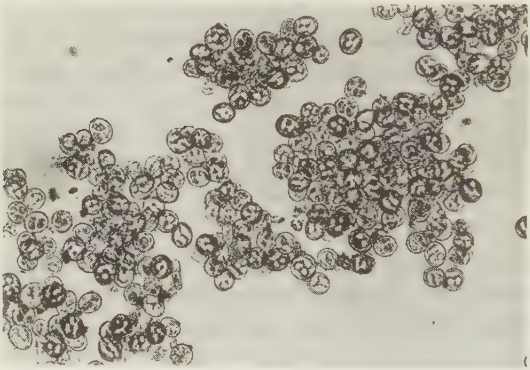

Abb. 1:
Angereicherte, sporulierte Oocysten von E. acervulina

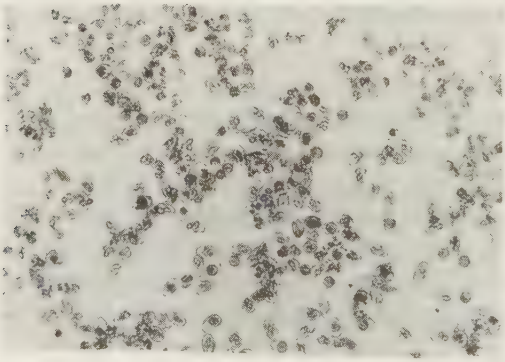

Abb. 2:
Angereicherte, sporulierte Oocysten von E. stiedae

4) Antigene:

Zur Immunisierung der Versuchstiere wurden fünf verschiedene Antigene, im Folgenden mit (A1, A2, A3, A4, A5) bezeichnet, verwendet. Als Ausgangsmaterial der Antigenherstellung dienten ausschließlich Sporocysten und sporulierte Oocysten der beiden genannten Coccidien-Arten.

a) Antigen (A1):

Gereinigte, sporulierte Oocysten von E. acervulina.

b) Antigen (A2):

Freie Sporocysten von E. acervulina wurden durch Zerreiben von 5o x $1o^6$ sporulierten Oocysten im Griffith-Mörser über 1o min gewonnen. Diese wurden in Alginat[1)] aufgeschwemmt injiziert.

c) Antigen (A3):

Zur Herstellung dieses Antigens wurden 4oo x $1o^6$ sporulierte E. acervulina-Oocysten zunächst im Griffith-Mörser 2o min zerrieben und anschließend im Eisbad für 1o min einer Ultraschallquelle (MSE-Gerät 6oW Modell 3ooo) ausgesetzt. Der Grad der Zerstörung wurde mikroskopisch überwacht. Es konnte festgestellt werden, daß noch viele Oocysten unzerstört und zahlreiche freie Sporocysten nach diesen mechanischen Einwirkungen in der Suspension enthalten waren. Die milchtrübe Suspension wurde auf insgesamt 3o ml Gesamtvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt.

Uber 24 h wurde bei +4° C unter leichtem Umrühren extrahiert. Im Anschluß hieran wurde bei 15.ooo Upm auszentrifugiert, der leicht opaleszierende Uberstand (1,4 mg N_2/1 ml) abgehoben, zu je 1 ml in Ampullen abgefüllt und lyophilisiert.

Dieser Antigen-Extrakt wurde sowohl ohne als auch mit Adjuvans injiziert. Als Adjuvans diente Alginat[1)].

d) Antigen (A4):

4oo x $1o^6$ gereinigte, sporulierte E. acervulina-Oocysten wurden bei -6o° C eingefroren, schnell aufgetaut und 3o min mit 36.ooo Upm zentrifugiert. Keine Oocyste war zerstört, das zeigte sich bei mikroskopischer Kontrolle.

1) MEDICAL ALGINATES, LTD.
Wadsworth Road
Perivale, Greenford, Middx., England

Daraufhin wurden die Oocysten bei 2ooo Upm auszentrifugiert, der klare Überstand wurde dekantiert und die Oocysten in Pelletform bei -2o° C eingefroren. Mit sterilem Seesand wurde der Pellet 2o min unter dauernder Kühlung im Porzellanmörser zerrieben. Die mikroskopische Kontrolle zeigte keine erkennbaren Partikel. Der Mörserinhalt wurde mit 27 ml steriler PBS ausgespült und die Suspension im Kühlraum (+4°C) 24 h lang in einer Schüttelapparatur bewegt. Anschließend wurde 5 min bei 5oo Upm zentrifugiert.
25 ml des milchigtrüben Oocystenextraktes wurden mit Aluminiumhydroxid ($\bar{a}\bar{a}$) intensiv gemischt und anschließend 24 h im Kühlraum (+4°C) geschüttelt. Die Vaccine diente als Antigen.
2 ml des Extraktes wurden nicht mit Aluminiumhydroxid versetzt, da sie in den Präzipitationsversuchen und in der KBR Verwendung finden sollen.

e) Antigen (A5):
Nach dem gleichen Verfahren wurde ein Extrakt aus 2oo x $1o^6$ E. stiedae-Oocysten hergestellt. Mit Aluminiumhydroxid wurde nicht gefällt, da der Extrakt ausschließlich als Kontrollantigen in den serologischen Testen dienen soll.

5) Antiseren:

a) Meerschweinchen-Versuch

Drei Meerschweinchen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen je 5 x $1o^3$ Oocysten (A1), suspendiert in 1 ml Aqua dest., s.c. injiziert. Nach Ablauf von je 1o Tagen wurde die Injektion 2-mal mit je 1o x $1o^3$ Oocysten wiederholt (s.Tab. 1). Die Serumgewinnung erfolgte 14 Tage nach der letzten Injektion durch Herzpunktion. Das Antiserum wurde bei -2o°C aufbewahrt.

Tabelle 1

Tag	Tierart	Antigen	Dosis	Applikation	Antiserum
1.	3 Meerschweinchen	A1	5x$1o^3$ Oocysten	s.c.	Serum-Meerschweinchen (SM-1, SM-2, SM-3)
2.		A1	"	s.c.	
3.		A1	"	s.c.	
13.		A1	"	s.c.	
23.		A1	"	s.c.	

b) Kaninchen-Versuche

Zwei Kaninchen wurde Antigen(A3),das in Alginat resuspendiert war, zunächst 2-mal i.m. injiziert. Die Injektionen wurden anschließend mit dem gleichen Antigen intravenös ohne einen Zusatz von Adjuvans fortgeführt (s. Tab.2). 1o Tage nach der letzten Injektion wurde durch Punktion der Ohrrandvene Serum gewonnen, welches bei -2o° C aufbewahrt wurde.

Tabelle 2

Tag	Tierart	Antigen	Dosis (1 Amp.=1,4 mg N_2)	Applikation	Antiserum
14.6.	2 Kaninchen	A3 mit Alginat	2 Ampullen	i.m	Serum-Kaninchen (SK-1 u. Sk-2)
18.7.		A3 mit Alginat	6 Ampullen	i.m.	
18.8.		A3 in 1 ml NaCl. phys.	1,5 Ampullen	i.v.	
22.8.		"	2,5 Ampullen	i.v.	
11.9.		"	3 Ampullen	i.v.	
24.9.		"	3 Ampullen	i.v.	
7.1o.		"	4 Ampullen	i.v.	

Ein Kaninchen wurde ausschließlich durch intravenöse Injektion mit Antigen (A3) immunisiert (s. Tab. 3). Die Serumentnahme erfolgte 1o Tage nach der letzten Injektion durch Punktion der Ohrrandvene. Das Serum wurde bei -2o° C aufbewahrt.

Tabelle 3

Tag	Tierart	Antigen	Dosis (1 Amp.=1,4 mg N_2)	Applikation	Antiserum
14.6.	1 Kaninchen	A3 in 1 ml NaCl.phys.	o,5 Ampullen	i.v.	Serum-Kaninchen (SK-3)
18.6.		"	o,5 Ampullen	i.v.	
21.6.		"	3 Ampullen	i.v.	
25.6.		"	3 Ampullen	i.v.	
28.6.		"	3 Ampullen	i.v.	
1.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
4.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
8.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
1o.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
12.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
15.7.		"	3 Ampullen	i.v.	
17.7.		"	3 Ampullen	i.v.	

Ein weiteres Kaninchen wurde mit Antigen (A1) sensibilisiert. Der Versuch wurde durch eine subcutane Injektion mit Antigen (A4) abgeschlossen (s. Tab. 4). Von diesem Versuchstier wurde 2-mal durch Punktion der Ohrrandvene Serum gewonnen, und zwar jeweils 14 Tage nach der letzten In-

jektion von Antigen (A1) und der Injektion von Antigen (A4). Die Seren wurden bei -2o° C gelagert.

Tabelle 4

Tag	Tierart	Antigen	Dosis	Applikation	Antiserum
15.1o.	1 Kaninchen	A1	$5x1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	Serum-Kaninchen (SK-4a)
18.1o.		A1	$1ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
21.1o.		A1	$15x1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
25.1o.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
29.1o.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
4.11.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
8.11.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
13.11.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
2o.11.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
6.12.		A1	$2ox1o^6$ in 1 ml NaCl.phys.	s.c.	
26.II.		A4	6,o ml	s.c.	

Mit Antigen (A4) wurden zwei Kaninchen immunisiert, die zunächst durch intramuskuläre Injektionen mit Antigen (A2), suspendiert in Alginat, sensibilisiert worden waren (s. Tab. 5). Die Serumgewinnung erfolgte 14 Tage nach der letzten Injektion durch Herzpunktion.

Tabelle 5

Tag	Tierart	Antigen	Dosis	Applikation	Antiserum
19.12. 68	2 Kaninchen	A2 mit Alginat	$5x1o^4$ in 2 ml Alginat	i.m.	Serum-Kaninchen (SK-5 u. SK-6)
21.1. 69		A4	2,o ml	s.c.	
27.1.		A4	2,o ml	s.c.	
4.2.		A4	2,o ml	s.c.	
24.2.		A4	6,o ml	s.c.	

Abschließend wurden zwei Kaninchen ausschließlich mit Antigen (A4) immunisiert. Die Injektion des Antigens erfolgte subcutan nach den Angaben von ROSE (182) 3-mal im Abstand von 5-7 Tagen; 19 Tage nach

der dritten Injektion wurde nochmals injiziert und das Serum nach Ablauf von weiteren 14 Tagen durch Herzpunktion gewonnen (s. Tab.6). Die Aufbewahrung erfolgte bei -2o° C.

Tabelle 6

Tage	Tierart	Antigen	Dosis	Applikation	Antiserum
1.	2 Kaninchen	A4	2 ml	s.c.	Serum-Kaninchen (SK-7 u. SK-8)
6.		A4	2 ml	s.c.	
13.		A4	2 ml	s.c.	
32.		A4	6 ml	s.c.	

6) Serumkonzentration:
Je 4 ml der Antiseren SK-5, SK-6, SK-7 und SK8 wurden gepoolt, lyophilisiert und durch Resuspension in Aqua dest. im Verhältnis von 4 : 1 eingeengt. Im Folgenden wird dieses Serumkonzentrat als Serum-pool (S-Sp) bezeichnet.

7) Serumkontrolle:
Von allen in den Versuchen eingesetzten Tieren wurde zu Beginn der Immunisierung Serum gewonnen, das in den Untersuchungen zum Nachweis serologischer Reaktionen als negative Serumkontrolle diente.

8) Agar-Gel-Präzipitationstest:
Die Agar-Gel-Präzipitation nach OUCHTERLONY (145, 146) wurde in Anlehnung an ROSE (182) in einem 1,5 %igen Agar-Medium mit einer Kochsalzkonzentration von 8 % bei einem pH-Wert von 7.6 durchgeführt. Antigen und Antiserum wurden nur einmal in die entsprechenden Vertiefungen gegeben, nachgefüllt wurde nicht.

9) Komplementbindungsreaktion:
Es wurde dem Prinzip der von FULTON und DUMBELL (s. WIGAND, 219) angegebenen Mikromethode gefolgt, wobei mit abgestuften Komplementverdünnungen (Faktor 1.3, das entspricht einem logarithmischen Wert von 0,139) und einem Überschuß an Antiserum gearbeitet wurde.
Die Antiseren wurden kurz vor Versuchsbeginn 30 min bei 56° C erhitzt und dadurch inaktiviert. Der Test wurde in Plexiglasplatten mit ent-

sprechenden Vertiefungen angesetzt. Für die Verdünnungen der Reaktionskomponenten wurde Veronal als Puffer verwendet. Als Komplement diente frisches Meerschweinchenserum. Zur spezifischen Bindung wurden die Platten über Nacht (etwa 16 h) bei +4° C gehalten und nach Zugabe des haemolytischen Systems 2 h bei 37° C bebrütet.
Beim Ablesen wurde der Punkt der 5o%igen Haemolyse bestimmt und der Komplementverbrauch des jeweiligen Reaktionssystems unter Berücksichtigung des eigenen Komplementverbrauches von Antigen und Serum nach der von WIGAND (219) angegebenen Methode berechnet.

1o) Immunofluoreszenzserologische Untersuchungen:
Zum Nachweis fluoreszierender Antikörper in den Antiseren wurde die indirekte Fluoreszenzantikörper-Reaktion (IFAR), auch Sandwich-Test genannt, deshalb verfolgt, weil sich diese Methode bei dem niedrigen Antikörpertiter von Seren im Anschluß an parasitäre Invasionen als ökonomischer erweist.
Mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien des E. acervulina-Stammes befallene Darmsegmente stammten von Junghennen, die in wechselnden Zeitabständen nach der Invasion getötet worden waren. Je ein ca. 2 cm langes Segment wurde bei -2o° C eingefroren. Anschließend wurden histologische, 4 µ dicke Schnitte mit dem Gefriermikrotom angefertigt und auf Objektträger durch Antrocknen fixiert. Ähnliche Schnitte wurden aus Kaninchenlebern angefertigt, die mit Entwicklungsstadien von E. stiedae befallen waren. Die Leberproben wurden ebenfalls von Herrn Dr. U. DÜRR, Gießen, zur Verfügung gestellt. Dünne Ausstriche von invadierter Darmschleimhaut auf Objektträger wurden ebenfalls lufttrocken fixiert. Schnittpräparate und Ausstriche wurden mit Antiseren überschichtet und in einer feuchten Kammer 45 min bei 37° C bebrütet. Hierauf wurde je 1o min in PBS und Aqua dest. gespült, luftgetrocknet, mit Fluoresceiinsothiocyanat konjugiertem Anti-Kaninchen-γ- Globulin[2] überschichtet und nochmals 45 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Gespült wurde wieder je 1o min in PBS und Aqua dest. und dann teilweise für 1o min mit einer Lösung von o,o5%igem Evan's Blue gegengefärbt, um evtl. vorhandene unspezifische Fluoreszenz auszu-

2) HYLAND: Div. Travenol Lab.
München

-schließen (ROGER, Mc COMB, 174). Abschließend wurde 3 x 10 min in PBS gewaschen, kurz in Aqua dest. gespült und mit gepuffertem Glycerin eingedeckt.

Betrachtet wurden die Präparationen im Fluoreszenzmikroskop, Leitz, Ortholux mit Vergrößerung 1:40, 1:400, Lichtquelle Osram HB 200, Blaufilter BG 12, Sperrfilter: Gelbfilter.

11.) Histologische Untersuchungen:
Zur Kontrolle der fluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden ebenfalls etwa 2 cm lange Darmsegmente in Fixierungsflüssigkeit nach STIEVE fixiert. 4µdicke Schnitte wurden nach der PAS-AO-Methode von WAGNER und FOERSTER (215) gefärbt und auf das Vorhandensein entsprechender parasitärer Stadien geprüft.

VII. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

1) Vorversuche zur Antigen- und Serumgewinnung
Der besseren Übersicht wegen seien zunächst noch einmal die 5 Antigene, die aus den gereinigten, sporulierten Oocysten der Coccidien E. acervulina des Huhnes und E. stiedae des Kaninchens gewonnen werden konnten, aufgeführt. Die Antigene sind im Folgenden mit (A1), (A2), (A3), (A4) und (A5) bezeichnet.

(A1): Gereinigte, sporulierte E. acervulina-Oocysten,

(A2): Sporocysten von E. acervulina mit Alginat als Adjuvans,

(A3): wässriger Extrakt aus sporulierten, zerstörten E. acervulina-Oocysten mit und ohne Zusatz von Alginat als Adjuvans (1,4 mg N_2/ml),

(A4): PBS-Extrakt aus sporulierten, zerstörten E. acervulina-Oocysten mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans (4,06 mg N_2/ml) und

(A5): PBS-Extrakt aus sporulierten, zerstörten E. stiedae-Oocysten (4,72 mg N_2/ ml).

Durch die Immunisierung der einzelnen Versuchstiere mit den unterschiedlichen Antigenen wurden folgende Seren gewonnen:

SM-1,SM-2,SM-3 : Seren von Meerschweinchen behandelt mit Antigen (A1),

SK-1,SK-2,SK-3 : Seren von Kaninchen behandelt mit Antigen (A3),

SK-4a :Serum eines Kaninchens behandelt mit Antigen (A1),

SK-4b :Serum desselben Kaninchens behandelt mit Antigen (A1) und Antigen (A4),

SK-5,SK-6 :Seren von Kaninchen behandelt mit Antigen (A2) mit Alginat als Adjuvans und Antigen (A4),

SK-7,SK-8 :Seren von Kaninchen behandelt mit Antigen (A4),

S-Sp :Serum-pool der Seren SK-5,SK-6,SK-7 und SK-8 im Verhältnis 4 : 1 eingeengt und

Serumkontrollen (K):Von den einzelnen Versuchstieren zu Versuchsbeginn gewonnen.

In den Vorversuchen zur Sensibilisierung von 3 Meerschweinchen (Seren SM-1,SM-2 und SM-3) mit Antigen (A1) und der 3 Kaninchen (Seren SK-1, SK-2 und SK-3) mit Antigen (A3) stellte sich heraus, daß die verwendete Menge des Antigens bzw. das Antigen selbst nicht zur Sensibilisierung der Versuchstiere ausreichte. Alle Untersuchungen dieser Seren zum Nachweis komplementbindender, präzipitierender oder mit Hilfe der indirekten Fluoreszensantikörper-Reaktion nachweisbarer Antikörper verliefen stets negativ.

2) Agar-Gel-Präzipitationstest

Zum Nachweis spezifischer serologischer Reaktionen wurden die restlichen Antiseren zunächst in der Agar-Gel-Präzipitation untersucht.

Die Antiseren SK-4a,SK-4b,SK-5,SK-6,SK-7 und SK-8 präzipitieren das Antigen (A4) (für diese Reaktion ohne Zusatz von Aluminiumhydroxid) in je einer Bande von unterschiedlicher Stärke (Abb. 3).

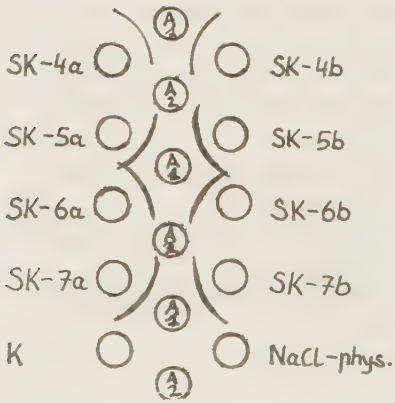

Abb. 3:
Präzipitationsreaktionen der Antiseren.
Antigen (A1) = E. acervulina-Antigen (A4)
Antigen (A2) = E. stiedae-Antigen (A5)

Von den mit Antigen (A2) mit Alginat als Adjuvans und Antigen (A4) sowie von den ausschließlich mit Antigen (A4) behandelten Kaninchen wurde jeweils 4 Wochen vor dem Abschluß der Immunisierung durch Blutentnahme Serum gewonnen. Diese Seren sind im Folgenden mit SK-5a, SK-6a, SK-7a und SK-8a bezeichnet.

Am schwächsten war die Reaktion des Antiserums SK-4a zu bezeichnen. Eine wenig markante Bande wurde erst nach 36 h sichtbar und verstärkte sich während der weiteren Beobachtungszeit nur unwesentlich. Die fortgeführte Immunisierung dieses Kaninchens mit Antigen (A4) verstärkte die Präzipitation, so daß bereits nach Ablauf von 24 h eine wenig deutliche Bande sichtbar wurde, die sich während der weiteren Beobachtungszeit verstärkte. Unterschiedlich war auch die Reaktionsstärke der Antiseren SK-5 und SK-6 im Vergleich zu den Seren SK-7 und SK-8. Während SK-5 und SK-6 bereits nach 18 h das Antigen (A4) in einer deutlich sichtbaren Bande präzipitierten, trat die Präzipitation bei den Seren SK-7 und SK-8 erst nach 24 h auf. Nach einer Beobachtungszeit von mindestens 4 Tagen war kein wesentlicher Unterschied in der Stärke der Banden festzustellen. Bei einem Vergleich der Seren, die 4 Wochen vor bzw. zum Abschluß der Immunisierung gewonnen wurden, konnte kein Unterschied in der Reaktionsstärke beobachtet werden.

Das Antigen (A5) wurde von keinem der Antiseren präzipitiert. Die negativen Serumkontrollen zeigten keine Präzipitationsreaktion, weder gegen Antigen (A4), noch gegen Antigen (A5). Aufgrund dieser Kontrollen kann die Präzipitationsreaktion der Antiseren gegen das Antigen (A4) als spezifisch angesehen werden.

3) Komplementbindungreaktion

ROSE (181) hat festgestellt, daß die Komplementbindungsreaktion im Vergleich zum Agar-Gel-Diffusionstest bei der Coccidiose der Kaninchen empfindlicher ist. Aufgrund dieser Feststellung wurde die Spezifität der Reaktion der Seren, die bereits im Agar-Gel-Präzipitationstest untersucht worden waren, anschließend auf ihren Gehalt an spezifisch reagierenden, komplementbindenden Antikörpern untersucht. Auch bei diesem Versuch wurde zur Kontrolle ein negatives Serum mitverwendet (K). Als Antigene wurden Antigen (A4) und Antigen (A5) vergleichend eingesetzt. Die Antigene und Antiseren wurden hierzu 1:4 mit Veronalpuffer

verdünnt. Das Serumkonzentrat (S-Sp) stellte hiernach unverdünntes Serum dar.
Bei der angewandten Mikromethode der KBR (WIGAND, 219) wird der Verbrauch des in verschiedenen Verdünnungsstufen (Faktor 1,3) vorliegenden Komplements gemessen. Der Komplementverbrauch der einzelnen Reaktionssysteme mit den unterschiedlichen Antigenen ist in der Abb.4 vergleichend dargestellt.

In der Untersuchung konnte festgestellt werden, daß die Immunisierung der Kaninchen mit Antigen (A1) allein, mit Antigen (A1) in Verbindung mit Antigen (A4), sowie mit Antigen (A2) zusammen mit Antigen (A4) und schließlich allein mit Antigen (A4) zur Bildung komplementbindender Antikörper geführt hatte.

Bei der Beurteilung der einzelnen Titer muß berücksichtigt werden, daß der Eigenverbrauch der beiden Antigene an Komplement stark differiert. Dieser Wert für Antigen (A5) ist etwa doppelt so hoch wie für Antigen (A4).

Das Antiserum SK-4a weist, analog dem Agar-Gel-Diffusionstest, den niedrigsten Titer komplementbindender Antikörper auf. Nach der Fortführung der Immunisierung mit Antigen (A4) erreicht der Titer in dem Serum SK-4b bei der Verdünnung 1 : 4 die gleiche Höhe wie in den übrigen Antiseren. In höheren Serumverdünnungen, die nicht untersucht werden konnten, müßte ein unterschiedlicher Titer zu erwarten sein. Der relativ niedrigere Titer des Serumkonzentrates (S-Sp) und des Serums SK-7 könnte auf den höheren Eigenverbrauch von Komplement durch diese Antiseren zurückzuführen sein.

Bei der Untersuchung der gleichen Seren mit dem Kontrollantigen (A5) fällt ein relativ hoher Komplementverbrauch auf, der besonders bei dem Kontrollserum (K) deutlich hervortritt. Wie bei den Untersuchungen von ROSE (181) konnte dieses Phänomen auf die Tatsache zurückgeführt werden, daß die Kaninchen auch über komplementbindende Antikörper gegen E. stiedae-Antigen verfügten. Die Tiere schieden vor Beginn und während der Immunisierung E.stiedae-Oocysten in unterschiedlicher Menge aus.
Interessant ist, daß mit Ausnahme des Serums SK-4b der Titer der

komplementbindenden Antikörper, hervorgerufen durch die natürliche Invasion mit E. stiedae, durch die Immunisierung mit E. acervulina-Antigenen angehoben wird. Eine Erscheinung, die vielfach zu beobachten ist und u.a. bei der unspezifischen Reiztherapie ausgenutzt wird. Der Unterschied der Reaktionen der einzelnen Antiseren gegen das Antigen (A4) und das Kontrollantigen (A5) ist auffallend; höhere Serumverdünnungen würden den Unterschied der Reaktionen deutlicher hervorheben. Bei der hohen Empfindlichkeit der Komplementbindung kann die Reaktion der Antiseren gegen das E. acervulina-Antigen (A4) als spezifisch betrachtet werden.

4) Immunofluoreszenzserologische Untersuchungen

Mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörper-Reaktion (IFAR) wurden Darmschnitte, Darmschleimhautausstriche und freie, in vitro excystierte Sporozoiten untersucht. Oocysten wurden nicht in die Untersuchung einbezogen, da sich diese wegen der starken Primärfuoreszenz der Hülle als ungeeignet erweisen. Die Schleimhaut der Därme, von denen die Nativpräparate angefertigt wurden, waren im Einzelnen mit Sporozoiten, Trophozoiten, Meronten und Merozoiten, sowie Schizonten I, II und Gamonten von E. acervulina invadiert. Der Nachweis dieser Entwicklungsstadien wurde zuvor im histologischen Schnitt nach der Methode von WAGNER und FOERSTER (215) geführt. In der Reaktion wurden die Antiseren SK-5, SK-6, SK-7, SK-8 und das Serumkonzentrat S-Sp auf einen Gehalt an Antikörpern untersucht, die mit Hilfe der IFAR sichtbar gemacht werden können.
Es zeigte sich, daß mit keinem der untersuchten Antiseren eine spezifische Fluoreszenz der untersuchten Entwicklungsstadien als Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht werden konnte. Es bestand mit Ausnahme der Gamonten von E. acervulina kein Unterschied in der Reaktion im Vergleich zu den negativen Kontrolluntersuchungen. Die Gamonten von E. acervulina zeigten ein geringgradig stärkeres Aufleuchten. Eine Spezifität der Reaktion kann aufgrund des zu geringen Fluoreszenzunterschiedes nicht abgeleitet werden.

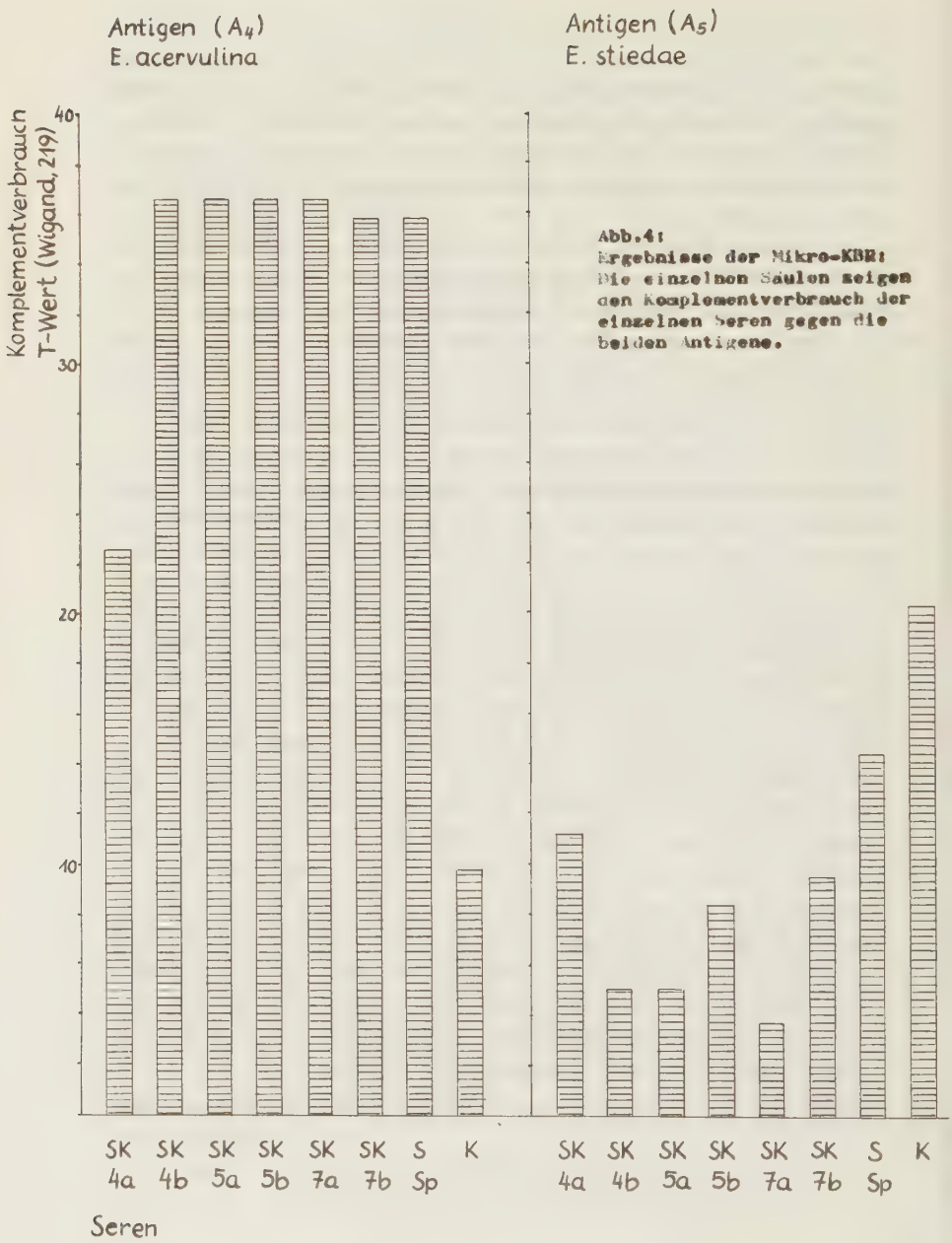

Abb.4:
Ergebnisse der Mikro-KBR:
Die einzelnen Säulen zeigen den Komplementverbrauch der einzelnen Seren gegen die beiden Antigene.

VIII. DISKUSSION

Seit TYZZER's ersten Arbeiten von 1929 über die Coccidien und Coccidiosen des Geflügels hat sich die Problematik dieser Parasitose durch geänderte Haltungsformen des betroffenen Wirtstieres grundlegend gewandelt. Die von TYZZER (2o8) ausgearbeiteten und vorgeschlagenen Anleitungen zur Differenzierung der Erreger und der durch diese hervorgerufenen Erkrankungen sind jedoch bis heute mit kleinen Abwandlungen und Verbesserungen diesselben geblieben.

Die Differenzierung der neun beim Huhn vorkommenden Coccidien-Species ist dringend erforderlich. Es besteht bei den einzelnen Arten eine unterschiedliche Therapieempfindlichkeit. Prognose und Therapie der Coccidiosen sind daher von einer exakten Diagnose abhängig.

Die von TYZZER empfohlenen Untersuchungsanleitungen werden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit kritisch überprüft. In Übereinstimmung mit anderen Autoren wird festgestellt, daß alle Methoden stets gleichzeitig herangezogen werden müssen und daher sehr material- und zeitaufwendig sind.

Die spezifischen Kriterien der Coccidien und Coccidiosen können nicht in jedem Fall von diesen diagnostischen Methoden erfaßt werden. Das Bild der Erkrankung wie auch die Entwicklung der Erreger variieren stark, da sie in einem hohen Maß von exo- und endogenen Einflüssen abhängig sind.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist es, die im Anschluß an Coccidioseerkrankungen oder nach der künstlichen Immunisierung mit Coccidien-Antigenen auftretenden und beschriebenen immunologischen und serologischen Reaktionen daraufhin zu überprüfen, ob diese als Ausgangspunkt einer Untersuchungsmethode dienen könnten, die den heutigen Erfordernissen gerecht würde.
Aus den immunologischen Untersuchungen geht hervor, daß zwischen den einzelnen Coccidiosen keine Kreuzimmunität besteht. ROSE (177, 178) räumt allerdings ein, daß diese selektive Immunität zwischen E. brunetti und E. maxima sowie zwischen E. necatrix und E. tenella nicht uneingeschränkt vorausgesetzt werden darf. Inwieweit diese Feststellungen zutreffen, kann zur Zeit nicht beurteilt werden, da entsprechende Überprüfungen ausstehen.

Die Frage, welche der Entwicklungsstadien während der endogenen Phase im Huhn als Antigen wirksam sind und immunologische und serologische Reaktionen nach überstandener Invasion hervorrufen, ist ebenso unbeantwortet geblieben wie die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Immunreaktion.

Die verbreiteste Ansicht ist, daß die Schizontenstadien immunogen wirksam sind. Eine Tatsache, die in der Beurteilung der Coccidiostatica ihre praktische Anwendung gefunden hat. Die Lehrmeinung, daß allein die Schizonten oder noch extremer ausgedrückt alle einzelnen Entwicklungsstadien eine jeweils spezifische Antigenität besitzen (ROSE, 176) kann nicht geteilt werden, denn dann müßte eine unterschiedliche Antigenstruktur in jedem Entwicklungsstadium vorausgesetzt werden. Dieses ist bisher nicht bewiesen. Die Entwicklungshemmung beginnt in den Darmzellen bereits bei den Sporozoiten und es ist nicht möglich, Tiere ausschließlich mit Gameten oder Merozoiten II zu immunisieren (ROSE, 178).

Die Immunität auslösende Wirkung der einzelnen Vermehrungsformen dürfte vielmehr in enger Relation zu der Zahl stehen, in der jene die Darmschleimhaut invadieren. Die Schizonten sind zahlenmäßig am stärksten vertreten. Sie stellen die größte Antigenmenge dar, mit der sich der Wirtsorganismus auseinandersetzen muß und dürften deshalb die stärkste, Immunität auslösende Antigenität besitzen. Daß auch die Sporozoiten als Antigen wirksam sein müssen, wird aus den eigenen Untersuchungen gefolgert.

Diesen immunologischen Reaktionen stehen beim Huhn und Kaninchen humorale Antikörper gegenüber, die im Anschluß an Coccidiosen oder nach künstlicher Immunisierung mit Coccidien-Antigenen nachgewiesen werden können. Zwischen beiden muß bei dieser Parasitose streng unterschieden werden, da die humoralen Antikörper im Immunitätsgeschehen bedeutungslos sind (4, 5, 16, 17, 18, 49, 131, 154, 182, 211).

Im Einzelnen konnten beim Huhn agglutinierende, präzipitierende und lysierende Antikörper nachgewiesen werden. Auch diese serologisch nachweisbaren Antikörper sind wie die immunologischen Reaktionen artspezifisch. Nur ROSE und LONG (18o) weisen auf eine Kreuzreaktion in dem

Präzipitationstest zwischen einem E. tenella- und E. necatrix-Antigen hin und deuten dieses Phänomen als Ausdruck einer Antigenverwandtschaft zwischen diesen beiden Arten.

Unberücksichtigt bleibt bei dieser Beurteilung allerdings, daß das Huhn, von dem das entsprechende Serum stammte, primär gegen die E. tenella-Coccidiose immunisiert worden war. Erst im Anschluß an eine später erfolgte Invasion mit E. necatrix trat die Kreuzreaktion auf. Diese Kreuzreaktion muß in Frage gestellt werden, da das Serum vor der nachträglich stattgehabten Immunisierung nicht auf evtl. noch vorhandene Antikörper gegen E. tenella-Antigen untersucht wurde. Außerdem präzipitierten Seren von primär gegen die E. necatrix-Coccidiose sensibilisierten Tieren die beiden Antigene nicht kreuzweise, wenn zusätzlich gegen E. tenella-Coccidiose nach einem gleichen Zeitraum immunisiert wurde.

Der Nachweis dieser humoralen Antikörper im Anschluß an Coccidiosen konnte auch für andere Tierarten wie die Pute und das Kaninchen erbracht werden. Beim Kaninchen konnte zusätzlich das Auftreten komplementbindender (ROSE, 182) und mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörper-Reaktion (IFAR) sichtbar zu machender Antikörper (ČERNÁ, 3o) demonstriert werden.

Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Reaktionen wird den eigenen Untersuchungen die Arbeitshypothese vorangestellt, daß überstandene Coccidiosen oder die Auseinandersetzung mit parenteral applizierten Coccidien-Antigenen beim Huhn immunologische und serologische Reaktionen hervorrufen, die mit geringen Einschränkungen für die neun beim Huhn auftretenden Coccidien-Arten selektiv spezifisch sind. In Anlehnung hieran ist es gelungen, mit Hilfe gereinigter Antigene von E. acervulina, einem Coccidium des Huhnes, die Bildung präzipitierender und komplementbindender Antikörper anzuregen. Aus den Untersuchungen mit einem Kontrollantigen wird gefolgert, daß die Antigenstruktur der einzelnen Coccidien-Species unterschiedlich sein könnte.

Mit Hilfe dieser Antiseren sollte in der vorliegenden Arbeit die IFAR dahingehend untersucht werden, ob diese an den Entwicklungsstadien von Coccidien Antigen-Antikörper-Reaktionen demonstrieren kann und

damit Eingang in die routinemäßige Coccidiendiagnostik finden könnte.

In der Durchführung dieser Untersuchung wurde darauf geachtet, daß ein Antigen zur Gewinnung der Antiseren benutzt wurde, von dem zu erwarten war, daß es verhältnismäßig einheitlich und insbesondere frei von Gewebsteilen des Wirtstieres war. ROSE (182), ROSE und LONG (18o), PIERCE et al. (155) und AUGUSTIN und RIDGES (4), die invadierte Schleimhaut, Gallengangsexsudat oder Schizonten II als Antigen zur Sensibilisierung benutzten, machten die Erfahrung, daß diese Antigenarten diesen Anforderungen nicht gerecht wurden. Besonders in dem Agar-Gel-Diffusionstest wurden Begleitreaktionen der betreffenden Gewebe gesehen und es bereitete Schwierigkeiten, unter den Präzipitationsbanden (bis zu 6) die spezifischen Reaktionen gegen das Parasiten-Antigen herauszufinden.

Unser Antigen wurde deshalb in verschiedenen Verfahren aus gereinigten, sporulierten E. acervulina-Oocysten gewonnen. Als Kontrollantigen diente ein Extrakt aus E. stiedae-Oocysten, einem Coccidium des Kaninchens deshalb, weil mit Sicherheit vorausgesetzt werden mußte, daß es sich um einen reinen Stamm handelt.

Bei der Immunisierung der Versuchstiere (Meerschweinchen und Kaninchen) konnte wie bei den Untersuchungen von ROSE (182) festgestellt werden, daß durch die Applikation des Antigens ohne einen Zusatz von Adjuvantien in Form von Alginat oder Aluminiumhydroxid die niedrigsten Antikörper erzielt werden.

In den Antiseren von 5 Kaninchen, die unterschiedlich sensibilisiert worden waren, ließen sich Antikörper nachweisen, die ausschließlich das zur Immunisierung benutzte E. acervulina-Antigen präzipitierten. Eine Kreuzreaktion gegen das E. stiedae-Antigen trat nicht auf. Um die Spezifität dieser serologischen Reaktion weiter abzusichern, wurden die gleichen Seren vor der Prüfung in der IFAR in der KBR untersucht.

Es wurde hierzu dem Prinzip der von FULTON und DUMBEL (WIGAND, 219) angegebenen Mikromethode gefolgt, die den Verbrauch des in verschiedenen Verdünnungsstufen (Faktor 1,3) vorliegenden Komplements mißt.

In der KBR konnten spezifische, komplementbindende Antikörper gegen

das zur Sensibilisierung eingesetzte E. acervulina - Antigen nachgewiesen werden. Der Nachweis komplementbindender Antikörper gegen ein Antigen des Coccids E. acervulina konnte damit zum ersten Mal erbracht werden.

Der Komplementverbrauch der Seren in der Reaktion mit dem E. stiedae - Antigen kann auf die Anwesenheit komplementbindender Antikörper gegen dieses Antigen, hervorgerufen durch die natürliche Auseinandersetzung der Kaninchen mit dieser Coccidien - Art zurückgeführt werden.

Die sehr großen Unterschiede des Komplementverbrauches der gleichen Seren zwischen der Reaktion mit dem E. acervulina- und dem E. stiedae - Antigen sprechen für eine erhebliche Spezifität der Reaktion, die in höheren Serumverdünnungen und ohne die Gegenwart komplementbindender Antikörper gegen das E. stiedae - Antigen noch deutlicher hervortreten würde.

Eine Mitreaktion präzipitierender Antikörper gegen das E. stiedae - Antigen wäre in dem Agar-Gel-Diffusionstest noch eher zu erwarten gewesen. Das Fehlen dieser Mitreaktion könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Antikörpergehalt für die nicht so empfindliche Präzipitationsreaktion zu gering war.

In der sich hieran anschließenden IFAR wurden Sporozoiten, Trophozoiten, Meronten und Merozoiten, Schizonten und Gameten von E. acervulina untersucht. Als Kontrolle dienten die gleichen Entwicklungsstadien von E. stiedae. Geprüft wurden diese Stadien in Schnitt- und Ausstrichpräparaten, die jeweils durch Lufttrocknung fixiert wurden. Die Einwirkungszeit der Antiseren und eines 4:1 eingeengten Serumkonzentrates sowie des mit Fluoresceinisothiocyanat konjugierten Anti-Kaninchen-Globulins betrug jeweils 45 min bei 37° C.

Bei der Verfolgung dieser Methode ist es nicht gelungen, eine spezifische Fluoreszenz der untersuchten Stadien zu erkennen, die als Ausdruck einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion gewertet werden könnte.

Worauf das Ausbleiben dieser Reaktion zurückzuführen ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Eine Begründung könnte darin liegen, daß der Antikörpergehalt der Seren nicht ausreichend hoch war. Daß mit Hilfe der IFAR nachweis-

bare Antikörper im Anschluß an Coccidiosen überhaupt nicht auftreten, kann aufgrund des Nachweises derselben durch ČERNÁ (3o) im Anschluß an die E. magna - Coccidiose des Kaninchens nicht behauptet werden. Leider hat ČERNÁ (3o) die Spezifität dieses Nachweises nicht durch weitere serologische Untersuchungen geprüft.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann die IFAR noch nicht für die routinemäßige Diagnostik der Coccidien und Coccidiosen vorgeschlagen werden, obgleich sie sich als einzige serologische Untersuchungsmethode aus technischen Erwägungen hierzu empfiehlt. Weitere Untersuchungen mit technischen Variationen sollen durchgeführt werden.

Es gelang jedoch der Nachweis, daß insbesondere die komplementbindenden Antikörper geeignet sind, für eine exakte Differenzierung von Coccidien - Antigen herangezogen zu werden.

Die Präzipitationsreaktion und KBR sind zwar im Vergleich zur IFAR ebenso spezifische Reaktionen, doch würde ihre Durchführung jeweils große Antigenmengen der zu bestimmenden Coccidien-Arten erforderlich machen, was keine Vereinfachung der üblichen Untersuchungsmethoden bedeuten würde.

IX. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Literaturübersicht über die Problematik der Coccidiosen des Huhnes unter Berücksichtigung der Diagnose dieser Parasitosen und der Differenzierung der Erreger gegeben.

Die immunologischen und serologischen Reaktionen im Anschluß an Coccidiosen wurden daraufhin überprüft, ob sie sich als Ausgangspunkt einer Untersuchungsmethode anbieten.

Hierzu wurden Kaninchen und Meerschweinchen mit Antigen aus E. acervulina-Oocysten, einem Coccidium des Huhnes, immunisiert. Als Kontrollantigen diente ein Extrakt aus den Oocysten von E. stiedae, einem Coccidium des Kaninchens.

Es gelang von Kaninchen Antiseren zu gewinnen, in denen im Agar-Gel-Diffusionstest spezifische Präzipitine gegen das zur Immunisierung eingesetzte Antigen nachweisbar waren.

Die Spezifität der Reaktion konnte in der Komplementbindungsreaktion (KBR) abgesichert werden.

Der Nachweis komplementbindender Antikörper gegen E. acervulina-Antigen wurde zum ersten Mal geführt.

Die entsprechenden Seren, die präzipitierende und komplementbindende Antikörper enthielten, wurden anschließend auf die Anwesenheit von Antikörpern untersucht, die mit Hilfe der indirekten Fluoreszenzantikörper-Reaktion (IFAR) sichtbar gemacht werden könnten.

Mit den verfolgten Methoden war es nicht möglich, eine spezifische Fluoreszenz als Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen.

Die indirekte Fluoreszenzantikörper-Reaktion (IFAR) kann daher noch nicht für die routinemäßige Diagnostik der Coccidien und Coccidiosen des Huhnes empfohlen werden, obwohl sich diese Reaktion als einzige serologische Untersuchungsmethode hierzu anbietet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AFIFI,A.K. and A.N.ACRA (1955): Concurrent demonstration of DNA and 1,2-glycols. 2. Periodate oxydation. Stain. Technol. 3o, 119-122

2. ALLEN,E.A. (1932): The influence of diet on the development of experimental coccidiosis in chickens kept under sanitary conditions. Amer. J. Hyg. 15, 163-185

3. ANDREWS,J.M. (1926): A factor in host-parasite specificity of coccidiosis Anat. Rec. 34, 154

4. AUGUSTIN,R. and A.P.RIDGES (1963): Immun mechanism in infections with Eimeria meleagrimitis of turkeys. In: "Immunity to Protozoa." (P.C.C. GARNHAM, ed.) Blackwell, Oxford.

5. BACHMAN,G.W. (193oa): Serological studies in experimental coccidiosis of rabbits. Amer. J. Hyg. 12, 624-64o

6. ____ (193ob): Immunity in experimental coccidiosis of rabbits. Amer. J. Hyg. 12, 641-649

7. BALL,S.J. (1966): The response of different strains of Eimeria acervulina and Eimeria tenella to medication. Res.vet.Sci.7, 312

8. ____ and E.W.WARREN (1965a): Synergism in the chemotherapy of Eimeria infections of chicks. Vet. Rec. 77, 1o28

9. ____, ____ (1965b): Treatment of experimental avian coccidiosis with a soluble combination of sulfaquinoxaline and diaveridine. Vet. Rec. 77, 1252

1o. BEACH,I.R. and J.L.CORL (1925): Studies in the control of avian coccidiosis. Poultry Sci. 4, 83-92

11. BEALE,G.H. and H.KACSER (1957): Studies on the antigenes of Paramecium aurelia with the aid of fluorescent antibodies. J. gen. Microbiol. 17, 68-74

12. BECKER,E.R., W.J.ZIMMERMANN, W.H.PATTILLO, and J.N.FARMER (1956): Measurements of the unsporulated oocysts of Eimeria acervulina, Eimeria maxima, Eimeria tenella and Eimeria mitis; coccidian parasites of the common fowl. Iowa Sta. Coll. J. Sci. 31, 79-84

13. ____, R.J.JESSEN, W.H.PATTILLO, and W.M.DOORNINCK, van (1956): A biometrical study of the oocysts of Eimeria necatrix, a parasite of the common fowl. J.Protozool. 3, 126-131

14. ____, W.J.ZIMMERMANN, and W.H.PATTILLO (1955): A biometrical study of the oocysts of Eimeria brunetti, a parasite of the common fowl. J. Protozool. 2, 145-15o

15. ____ (1952): "Protozoa" in: "Diseases of Poultry by BIERSTER and SCHWARTE, 2 nd Ed. Iowa State College Press. Ames, Iowa USA pp 913-976

16. ____ (1935): The mechanism of immunity in murine coccidiosis. Amer. J. Hyg. 21, 389-404

17. ____ and P.R.HALL (1933): Cross immunity and correlation of oocyst production during immunization between E. miyairii Amer. J. Hyg. 18, 220-223

18. ____, ____ and A.HAGAR (1932): Quantitative, biometric and host-parasite studies on Eimeria miyairii and Eimeria separata in rats. Iowa Sta. Coll. J. Sci. 6, 299-316

19. BERTKE,E.M. (1955): Pathological effects of coccidiosis caused by the protozoan parasite Eimeria tenella in chickens. Doctoral Thesis, Univ. of Wisc. Library

20. BIESTER,H.E. and L.H.SCHWARTE (1965): "Diseases of Poultry". 5th Ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa USA

21. BLUMENTHAL,F. (1908): Zur Serodiagnose der Syphilis. Diskussion: (Wassermann Reaktion und Kokzidiose der Kaninchen). Berl.klin.Wschr. 45, 618-620

22. BOCH,J. und K.BRONSCH (1966): Der Einfluß der Vitamine auf den Ablauf der Parasiteninvasionen höherer Tiere. Tierärztl. Umsch. 21, 62-69

23. BOLES,J.I. and E.R.BECKER (1954): The development of Eimeria brunetti Levine in the digestive tract of chickens. Iowa Sta. Coll. J. Sci. 29, 1-26

24. BOWIE,R.A.,J.P.CAIRNS, M.S.GRANT, A.HAYES, W.G.M.JONES, and J.F. RYLEY (1967): A new wide - spectrum coccidiostat. Nature 214, 1349

25. BRACKETT,S.and A.BLIZNICK (1952): The relative susceptibility of chickens of different ages to coccidiosis caused by Eimeria necatrix. Poultry Sci. 31, 146-148

26. ____ (1952): The reproductive potential of five species of coccidia of the chicken as demonstrated by oocyst production. J. Parasit. 38, 133-139

27. BRITTON,W.M.,C.H.HILL, and C.W.BARBER (1964): A mechanism of interaction between dietary protein levels and coccidiosis in chicks. J. Nutrit. 82, 306-310

28. BURNS,W.C. and J.R.CHALLEY (1965): Serum lysins in chickens infected with Eimeria tenella. J. Parasit. 51, 660-668

29. ____, ____ (1959): Resistance of birds to challenge with Eimeria tenella. Exptl. Parasit. 8, 515-526

3o. ČERNÁ,Z. (1966): Anwendung der indirekten Fluoreszenzantikörperreaktion zum Nachweis der Antikörper bei Kaninchenkokzidiose.
Zbl.Bakt. - Abt. I Orig. 199, 264-267

31. CHALLEY,J.R. and W.C.BURNS (1959): The invasion of the cecal mucosa by Eimeria tenella sporozoites and their transport by macrophages.
J.Protozool. 6, 238-241

32. CHAPMAN,J. (1929): A study of coccidiosis in an isolated rabbit colony. The clinical symptomes, pathology, immunology and therapy.
Amer. J. Hyg. 9, 389-429

33. CLARKE,M.L. (1964): A mixture of Diaveridin and Sulfaquinoxalin (Darvisol) as a coccidiostat for poultry.
Vet. Rec. 76, 818-822

34. CLARK,D.T., C.K.SMITH, and R.B. DARDAS (1962): Pathological and immunological changes in gnotobiotic chickens due to Eimeria tenella.
Poultry Sci. 41, 1633-1636

34a.DALLENBACH,F. und G.PIEKARSKI (196o): Über den Nachweis von Toxoplasma gondii im Gewebe mit Hilfe markierter fluoreszierender Antikörper (Methode nach Coons).
Virchows Arch. path. Anat. 333, 6o7-618

35. DAVIES,S.F.M., L.P.JOYNER, and S.B.KENDALL (1963): "Coccidiosis."
Verlag: Oliver and Boyd Edinburgh and London
264 pp.

36. ____ (1959): Relationship between sites of schizogonie and the pathogenicity to poultry of species of Eimeria
Transact. Roy. Soc. Trop. Med. 52, 3o2

37. ____ (1956): Intestinal coccidiosis in chickens caused by Eimeria necatrix.
Vet. Rec. 68, 853-857

38. DOORNINCK,W.M. van and E.R.BECKER (1957): Transport of sporozoites of Eimeria necatrix in macrophages.
J.Parasit. 43, 4o-44

39. DORN,P. (1966): Über den Wandel der Geflügelkrankheiten.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 79, 278-282

4o. EDGAR,S.A. and C.FLANAGAN (1966): Coccidiostatic and other effects of buquinolate in poultry.
Poultry Sci. 45, 1o81

41. ____ and C.T.SIEBOLD (1964): Eimeria mivati: A new coccidium of chickens.
J. Parasit 5o, 193-2o4

42. ____ (1953): Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia.
J.Parasit. 41, 214-216

43. ____ (1954): Effect of temperature on the sporulation of oocysts of the protozoon Eimeria tenella.
Transact. Amer. Microsc. Soc. 73, 237-242

44. ____ (1944): The development of the protozoon parasite Eimeria tenella, Railliet and Lucet, 1891, in the domestic fowl.
Doctoral Thesis University of Wisconsin, 1944

45. ENGLE,A.T., R.P.HUMPHREY, and C.A.JOHNSON (1967): Buquinolate, a new broadspectrum coccidiostat.
Poultry Sci. 45, 1082; 46, 81o

46. ERASMUS,I. (1961): Differences in the utilization of beta - carotene and true Vitamin-A by chickens.
Vortrag: Soc. for Advancement of anim. Nutrit. in South Africa Pretoria 5. April

47. ESSENFELD,E. and R.H.FENNEL (1964):Immunofluorescent study of experimental Trypanosoma cruzi infection.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 728-73o

48. FARR,M.M. (1943): Resistance of chickens to cecal coccidiosis.
Poultry Sci. 22, 277-286

49. FITZGERALD,P.R. (1964): Attempted immunization of young calves against Eimeria bovis.
J. Protozool. 11, 46

5oa.FLECKSEDER,R., and K.STEJSKAL, von (19o4): Biologische Reaktionen mit Bandwurmextrakten.
Wiener klin. Wschr. 17, 793

5o. FRITZSCHE,K. und E.GERRIETS (1962): "Geflügelkrankheiten."
2. Auflage Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg

51. GERRIETS,E. (1966): Die coccidiostaticafreie Massenaufzucht von Junghennen unter Vitamin-A Schutz.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 79, 271-275

52. ____ (196o): Die praeventive Wirkung des Vitamin-A bei der Blinddarmkokzidiose der Hühnerküken.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 67, 485-488

53. GILL,B.S. (1954): Specification and viability of poultry coccidia in 12o fecal samples preserved in 2,5 per cent potassium dichromate solution.
Indian J. vet. Sci. 24, 245-247

54. GOLDMAN,M. (1957): Staining Toxoplasma gondii with fluorescein - labelled antibody.
I. The reaction in smears of peritoneal exsudate.
J. Exper.Med. 1o5, 549-556

55. ____ (1953): Cytochemical differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli by means of fluorescent antibody.
Amer. J. Hyg. 58, 319-325

56. GRATZL,E. und H.KÖHLER (1968): "Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten."
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1968

57. GREUEL,E. und E.E.HILBRING (1968): Coyden 25 als Coccidiostaticum in Dosierungen von 1oo bzw. 125 ppm in Geflügelmastfutter.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 75, 262-266

58. ____ (1967a): Untersuchungen zur coccidiostatischen Wirkung von Zoalen bei experimenteller Infektion mit Eimeria acervulina.
Tierärztliche Umsch. 22, 25-33

59. ____ (1967b): Untersuchungen zur Therapie der experimentellen Coccidiose mit DOT - solubile.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 74, 1o-13

6o. ____ (1964): Amprolium, ein wirksames Coccidiotherapeuticum.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 71, 229-234

61. GREVEN,U. (1953): Zur Pathologie der Geflügelcoccidiose.
Arch. Protistenk. 98, 341-414

62. GRZIMEK,B. und I.GYLSTORFF (1957): "Krankes Geflügel."
Verlag F. Pfennigstorff, Berlin

63. GYLSTORFF,I. (1959): Praxiserfahrungen bei der Anwendung von Kokzidiostatika für Phrophylaxe und Therapie.
Arch. Geflügelk. 23, 47-53

64. HAASE,A. (1939): Untersuchungen über die bei deutschen Wildhühnern vorkommenden Eimeria-Arten.
Arch.Protistenk. 92, 33o-383

65. HABEDANK,W.-D.(1967): Coccidiose als Modell für die Trypsinaktivierung und -inhibierung.
Inaug. Diss. München, 1967

66. HALL and WIGDOR (zit. nach MOREHOUSE,N.F.) aus: The reaction of the immune intestinal epithelium of the rat to reinfection with Eimeria nieschulzi.
J. Parasit. 24, 311 (1918)

67. HAMMOND,D.M., F.L.ANDERSEN, and M.L.MINER (1964): Response of immunized and nonimmunized calves to cecal inoculation of first - generation merozoites of Eimeria bovis.
J.Parasit 5o, 2o8

68. ____, ____, ____ (1963): The site of the immun reaction against Eimeria bovis in calves.
J.Parasit. 49, 415-424

69. ____, A.R.HECKMANN, M.L.MINER, C.M.SENGER, and P.R.FITZGERALD (1959): The life - cycle stages of Eimeria bovis affected by the immune reaction in calves.
Exptl. Parasit. 8, 574-58o

7o. HARTWIGK,H. und J.FEHLBERG (1966): Experimentelle Infektionen von Broilerküken und Junghähnen mit geringen Dosen von Eimeria (E.) acervulina.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr.79, 261-263

71. HEMSLEY,L.A. (1964): Experiences of coccidiosis in young chickens fed a coccidiostat with particular reference to the incidence of coccidiosis in broiler chickens in the South of England 1961 - 1964. Vet.Rec. 76, 1432-1436

72. HERLICH,H. (1965): Effect of chicken antiserum and tissue extracts on the oocysts, sporozoites and merozoites of Eimeria tenella and E. acervulina. J. Parasit. 51, 847-851

73. ____ (1961): The serology and immunology of coccidiosis in chickens. Diss. Abs. 22, 1753-1754

74. HERRICK,C.A.,G.L.OTT, and C.E. HOLMES (1936): Age as a factor in the development of resistance of the chicken to the protozoan parasite, Eimeria tenella. J. Parasit. 22, 264.-272

75. HILBRICH,P. (1967): Anleitung zur Diagnose der Kokzidiosen des Huhnes Verlag: Hermann Kuhn, KG, Schwenningen a. Neckar

76. ____ (1965): Coccidiostaticadosierungen und Broilerwachstum. Dtsch. tierärztl.Wschr. 72, 417-420

77. ____ (1964): Die Kokzidiosen des Huhnes und ihre Bekämpfungsmöglichkeiten. Dtsch.tierärztl.Wschr. 71, 559-562 u. 615-618

78. HOFFMANN,B.,M.MERKENSCHLAGER und H.ZUCKER (1965): In vivo-Aktivierung des Trypsins durch zweiwertige Kationen. Naturwissenschaften 15, 454

79. HOLMES,C.E., C.A.HERRICK, and G.L.OTT (1937): Studies in coccidiosis of chickens. Calcium carbonate additions and coccidia. Poultry Sci. 16, 335-336

80. HORTON-SMITH,C. and P.L.LONG (1966): The fate of the sporozoites of Eimeria acervulina, Eimeria maxima and Eimeria mivati in the ceca of the fowl. Parasitology 56, 569-574

81. ____, ____ (1965): The development of Eimeria necatrix Johnson, 1930 and Eimeria brunetti Levine, 1942 in the ceca of the domestic fowl (Gallus domesticus). Parasitology, 55, 401-405

82. ____, ____ (1963a): Coccidia and coccidiosis in the domestic fowl and turkey. Adv. Parasit. 1, 67-107

83. ____, ____ (1963b): Immunity to coccidia in domestic animals. In: Immunity to Protozoa: 273-295 P.C.C. GARNHAM, A.E. PIERCE and J. ROITT (eds.) Oxford: Blackwell Scientific Publications

84. ____, ____, and A.E. PIERCE (1963): Observations on the behavior of invasive stages of Eimeria tenella in the immune fowl (Gallus domesticus).
Exptl. Parasit. 13, 66-74

85. ___, J.BEATTIE and P.L.LONG (1961): Resistance to Eimeria tenella and its transference from one cecum to the other in individual fowls.
Immunology 4, 111-121

86. HORTON-SMITH,C. (196o): Coccidiosis.
Vet. Rec. 72, 967-97o

87. ____ (1953): Coccidiosis in fowls.
Tschr. diergeneesk. 78, 9o7-911

88. ____ (1949): Some factors influencing the origine and course of epidemics of coccidiosis in poultry.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 52, 449-457

89. ____ (1947): Coccidiosis - some factors influencing its epidemiology.
Vet. Rec. 59, 645-648

9c. ____ and E.L.TAYLOR (1945): Sulfamezathine in the drinking water as a treatment for cecal coccidiosis in chickens.
Vet. Rec. 57, 35-36

91. HOTCHKISS,R.D. (1948): A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations.
Arch. Biochem. 16, 131-141

92. IKEDA, I. (1957): V. Organ specificity of Eimeria infection.
Jap. J. Vet. Sc. 19, 111-113

93. INGRAM,R.L., L.B.OTKEN, and J.R.JUMPER (1961): Staining of malarial parasits by the fluorescent antibody technique.
Proc.Soc. Exper.Biol. Med. 1o6, 52-54

94. ISAAK,S., and F.FELDEN, van den (19o4): Eine spezifische Praezipitinreaktion bei Bothriocephalus latus beherbergenden Menschen.
Deutsche med. Wschr. 3o, 982-983

95. ITAGAKI,K. and M.TSUBOKURA (1955): Studies on coccidiosis in fowls. IV. On the agglutination by merozoites.
Jap. J. Vet. Sc. 17, 139-143

96. JANKIEWICZ,H.A. (1942): The relation of the severity of symptomes and the degree of acquired immunity in chicks infected with graduated doses of Eimeria tenella.
Doctoral Thesis Univ.S. Calif., 1942

97. JOHANSSON,K.R. and W.B.SARLES (1948): Bacterial population changes in the ceca of young chickens infected with Eimeria tenella.
J.Bact. 56, 635-647

98. JOHNSON,W.T. (1938): Coccidiosis of the chicken with special reference to species.
Oreg. Agr. Coll. Exper. Sta. Bull. 358, 3-33

99. ____ (1932): Immunity to coccidiosis in chicken produced by inoculation through the ration.
J. Parasit. 19, 16o-161

1oo. ____ (1927): Immunity or resistance of the chicken to coccidial infection.
Oreg. Agr. Coll. Exper. Sta. Bull. 23o, 1-16

1o1. ____ (1924): (zit. nach MUHS,K.H.,) aus: Untersuchungen über die Wirkungsweise der Sulfonamide auf die Entwicklungsstadien der Eimeria-Arten im Küken.
Inaug.Diss. Gießen, 1951

1o2. ____ (1923): (zit. nach URICCHIO,W.A.) aus: The feeding of arteficially altered oocysts of Eimeria tenella as a means of establishing immunity to cecal coccidiosis in chickens.
Proceedings of Helminthol. Soc. Wash. 2o, 77 (1953)

1o3. JOYNER,L.P., S.F.M.DAVIES, and S.B.KENDALL (1963): Chemotherapie of coccidiosis.
Exptl.Chemotherapie, I, 445

1o4. ____, ____ (196o): Detection and assessment of sublethal infections of Eimeria tenella and Eimeria necatrix.
Exptl. Parasit. 9, 243-249

1o5. KAGAN,I.C. (1958): Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis.
The Rice Institute Pamphlet No. 45, 151-183

1o6. KEMLER,A. and W.M. REID (1961): Incidence of the coccidian species, Eimeria necatrix, among Georgia broilers as determinated by challenge techniques.
Poultry Sci. 4o, 6o-63

1o7. KENDALL,S.B. and F.S.Mc CULLOUGH (1952): Relationship between Sulfamezathine therapy and the acquisition of immunity to Eimeria tenella.
J. Comp. Path. 62, 116-124

1o8. KENT,N.H. (1963): V. Antigens (Seminar on Immunity to parasitic Helminths.)
Exptl. Parasit. 13, 43-56

1o9. KOUWENHOVEN,B. (1967): Die Wirkung einiger Kokzidiosemittel gegen Eimeria acervulina beim Huhn.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 74, 41-44

11o. ____ (1966): The Value of various coccidiostats and of some coccidiotherapeutics against a Netherlands strain of E.acervulina.
Tschr. diergeneesk. 91, 233

111. KRAMÁR,J.,Z. ČERNÁ und. J.CHALUPSKY (1964): Immunofluoreszenzreaktionen in der serologischen Diagnostik der Toxoplasmose.
Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 193, 523-534

112. KREMER,M. (1957): Die Coccidiosen der Hühnerküken im Lichte deutscher und ausländischer Forschung.
Inaug. Diss. Gießen, 1957

113. KRÜGER,J. (1967): Immunität nach Kokzidieninfektionen des Haushuhnes.
Eine Literaturstudie
Inaug. Diss. Hannover, 1967

114. KUCZYNSKI,M.H. (1921): Über die Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen.
Berl. klin. Wschr. 58, 125-126

115. LEATHEM,W.D. and W.C.BURNS (1967): Effects of the immune chicken on the endogenous stages of Eimeria tenella.
J. Parasit. 53, 18o-185

116. LEATHEM,W.D. (1966): Studies on the behaviour of the protozoon parasite, Eimeria tenella, in immune chickens.
Diss. Abstr. 26, 56o5

117. LEVINE,L. (1954): The effect of cecal coccidiosis on the ability of the chicken to do muscular work.
Doctoral Thesis, Univ. Wisconsin, 1954

118. ____, and C.A.HERRICK (1954): The effects of the protozoon parasite, Eimeria tenella, on the ability of the chicken to do muscular work when its muscles are stimulated directly and indirectly.
J. Parasit. 4o, 525-531

119. LEVINE,P.P. (1945): Specific diagnosis and chemotherapy of avian coccidiosis.
J.Amer. Vet. Med. Ass. 1o6, 88-9o

12o. ____ (1942c): A new coccidium pathogenic for chickens, Eimeria brunetti n. sp. (Protozoa: Eimeriidae).
Cornell Vet. 32, 43o-439

121. ____ (1938): Eimeria hagani n. sp. (Protozoa: Eimeriidae) a new coccidium of the chicken.
Cornell Vet. 28, 263-266

122. LONG,P.L. (1968): The pathogenic effects of Eimeria praecox and E. acervulina in the chicken.
Parasitology 58, 691-7oo

123. ____ (1967a): Studies on Eimeria praecox Johnson, 193o, in the chicken.
Parasitology 57, 351-361

124. ____ (1967b): Studies on Eimeria mivati in chickens and a comparison with Eimeria acervulina.
J. Comp. Path. 77, 315-325

125. LONG,W.M. and B.J. MILLARD (1967): The effect of metichlorpindol on Eimeria infections of the fowl.
Vet. Rec. 81, 11

126. LONG,P.L. (1966): The growth of some species of Eimeria in avian embryos.
Parasitology 56, 575-581

127. ____ (1965): Development of Eimeria tenella in avian embryos. Nature 2o8, 5o9-51o

128. ____ and M.E.ROSE (1965): Active and passive immunization of chickens against intravenously induced infections of Eimeria tenella. Exptl. Parasit. 16, 1-7

129. ____ and A.E.PIERCE (1963): Role of cellular factors in the mediation of immunity to avian coccidiosis (Eimeria tenella). Nature 2oo, 426-427

13o. ____, M.E.ROSE, and A.E.PIERCE (1963): Effects of fowl sera on some stages in the life cycle of Eimeria tenella. Exptl. Parasit. 14, 21o-217

131. ____, ____ (1962): Attempted transfer of resistance to Eimeria tenella infections from domestic hens to their progeny. Exptl. Parasit. 12, 75-81

132. LONG,P.L. (1959): A study of Eimeria maxima Tyzzer, 1929, a coccidium of the fowl (Gallus gallus). Ann. Trop. Med. 53, 325-333

133. LÖLIGER,H.CH. und H.J.SCHUBERT (1967): Der Haematokritwert von gesunden und kranken Hühnern verschiedener Altersgruppen und sein diagnostischer Anwendungsbereich. Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 8o, 171-176

134. LOTZE, J.C. and R.G. LEEK (1961): A practical method for culturing oocysts in tapwater. J.Parasit. 47, 588-59o

135. MARCUSE,K. (1922): Wassermannsche Reaktion und Kokzidiose beim Kaninchen. Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 87, 355-362

136. Mc DERMOTT,J.J. and L.A.STAUBER (1954): Preparation and agglutination of merozoite suspensions of the chicken coccidian, E. tenella. J. Parasit. 4o, (Suppl.): 23(Abstr.)

137. Mc MANUS,J.F.A. (1946): Histological demonstration of mucin after periodic acid. Stain. technol. 23, 99-1o8

138. MIERT, van M. und B.KOUWENHOVEN (1968): Pluimvee coccidiose. Diagnose en chemotherapeutische mogelijkheden. Tschr. diergeneesk. 93, 879-897

139. MOREHOUSE,N.F. (1938): The reaction of the immune intestinal epithelium of the rat to reinfection with Eimeria nieschulzi. J. Parasit. 24, 311-317

14o. MORRISON,W.D., A.E.FERGUSON, M.C.CONNEL, andJ.K. Mc GREGOR (1967): Efficacy of various drugs for the prevention of experimentally induced coccidiosis in chicken. Poultry Sci. 46, 391

141. ____, ____, ____, ____ (1966): The efficacy of various drugs against coccidiosis in broiler chickens.
Poultry Sci. 45, 1107

142. NATT,M.P. (1959): The effect of cecal coccidiosis on the blood cells of the domestic fowl.
3. The changes in the leucocyte picture during the course of infection.
Exptl. Parasit. 8, 182-187

143. ____ (1956):The effect of cecal coccidiosis on the blood cells of the domestic fowl.
II.The changes in the blood volume during the course of the infection.
Poultry Sci. 35, 311-316

144. ____ and C.A.HERRICK (1955): The effect of cecal coccidiosis on the blood cells of the domestic fowl.
I. A comparison of the changes in the erythrocyte count resulting from hemorrhage in infected and mechanically bled birds.
The use of the hematocrit volume as an index of the severity of the hemorrhage resulting from the infection.
Poultry Sci. 34, 1100-1106

145. OUCHTERLONY,O. (1953): Antigen - antibody reactions in gels.
IV. Types of reactions in co- ordinates systems of diffusion.
Acta apth. microbiol. Scand. 32, 231-241

146. ____ (1949): Antigen - antibody reactions in gels.
Ark. Kemi. Min. Geol. 826, 1-9

147. PATERSON,S.W. (1923): A complement - fixation test in coccidiosis of the rabbit.
Brit. J. Exper. Path. 4, 1-4

148. PATTILLO,W.H. (1959): Invasion of the cecal mucosa of the chicken by sporozoites of Eimeria tenella.
J. Parasit. 45, 253-258

149. ____ (1957): Comparative histochemical studies on the endogenous stages of Eimeria tenella and Eimeria necatrix.
Iowa Sta. Coll. J. Sci. 31, 492

150. PELLÉRDY,L.P. (1965): "Coccidia and Coccidiosis."
Verlag: Akademiai Kiadó Publishing House of the Hungerian Academy of Science Budapest, 1965

151. ____ (1963): Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der Vitamin-A-Versorgung und der Blinddarmkokzidiose der Küken.
Angew. Parasitol. 4, 129-133

152. PETERSON,E.H. and J.La BORDE (1962): A laboratory and field evaluation of amprolium - a new anticoccidial.
Poultry Sci. 41, 207-213

153. PIERCE,A.E. and P.L.LONG (1965): Studies on acquired immunity to coccidipsis in bursaless and thymectomized fowls.
Immunology 9, 427-439

154. ____, ____, and C.HORTON-SMITH (1963): Attempts to induce a passive immunity to Eimeria tenella in young fowls (Gallus domesticus).
Immunology 6, 37-47

155. ____, ____, ____ (1962): Immunity to Eimeria tenella in young fowls (Gallus domesticus).
Immunology 5, 129-152

156. POHL,R. (1965): Beitrag zur Diagnostik der Coccidienarten des Huhnes.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 72, 23o-232

157. PRATT,J. (1941): The effect of Eimeria tenella upon the glycogen stores of the chicken.
Amer. J. Hyg. 34c, 54-61

158. ____ (194o): The effect of Eimeria tenella upon the blood sugar of the chicken.
Transact. Amer. Microscop. Soc. 59, 31-37

159. RADKE,E. (1967): Untersuchungen über das Vorkommen und die wirtschaftliche Bedeutung der verschiedenen Coccidienspecies beim Jungmastgeflügel unter besonderer Berücksichtigung der hygienischen Verhältnisse.
Inaug. Diss. Hann., 1967

16o. REHM,W.F., H.THOMMEN und H.WEISER (1968): Zur Frage der Wirkung von potenzierten Sulfonamiden bei Coccidien - Infektionen.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 81, 34o-343

161. REID,W.M. and R.W.BREWER (1967): Efficacy studies on metichlorpindol as a coccidiostat.
Poultry Sci. 46, 638

162. ___, ___ (1966): Studies on the efficacy of metichlorpindol as a coccidiostat.
Poultry Sci. 45, 1118

163. ___ and C.D.MURPHY (1966): Relationships between coccidiostats and coccidiosis control.
Georgia Veterinarian 18, 7-1o

164. ___, K.FRIEDHOFF, O.HILBRICH, J.JOHNSON, and S.A.EDGAR (1965): The occurrence of the coccidium species Eimeria mivati in European poultry.
Zschr. Parasitenk. 25, 3o3-3o8

165. REID,W.M. (1964): A diagnostic chart for nine species of fowl coccidia.
Georgia Agricultural Experiment Stations.
University of Georgia Colledge of Agriculture,
Technical Bulletin N.S. 39

166. ____ (1963): Eimeria maxima - pathogenicity and incidence in Georgia broilers.
Amer. J. Vet. Res. 24, 174-178

167. ____, N.N.SHARMA and J.KEENER (1961): Intestinal species of coccidia in chickens from Georgia.
J. Parasit 47. (4. Suppl.45) No. 1o1

168. REID,W.M. (196o): The relationship between coccidiostats and poultry flock immunity in coccidiosis control programs.
Poultry Sci. 39, 1431-1437

169. ____ (1959a): Are coccidiosis problems increasing ?
Poultry Trib. March. 56, 62-64

17o. ____ (1959b): Delays in establisment of flock immunity due to the use of coccidiostats.
Poultry Sci. 38, 124o

171. RIDGES,P.A. (1962): Immunity to Eimeria meleagrimitis.
Transact. Roy. Soc. Trop. Med. 56, 8

172. RIEDEL,G. (1966): Über den Einfluß zweiwertiger Kationen im Futter auf die Blinddarm-Coccidiose des Huhnes.
Inaug. Diss. München, 1966

173. RIPSOM,C.A. and C.A.HERRICK (1945): Effects of variable sulfa-compounds on the protozoan parasite, Eimeria tenella.
J. Parasit 31, 98

174. ROGER,L.N. and D.E.Mc COMB (1962): Immunfluorescent studies with Trachoma and related antigens.
J. Immunol. 89, 545-554

175. ROGERS,E.F., R.L.CLARK, H.J.BECKER, A.A.PESSOLANO, W.J.LEANZA, E.C. Mc MANUS, F.J.ANDRIULI, and A.C.CUCKLER (1964): Antiparasitic drugs. V. Anticoccidial activity of 4-amnio-2- ethoxy-benzoic acid and related compounds.
Proc. Soc. Exper.Biol. Med. 117, 488

176. ROSE,M.E. (1968): In:"Immunity to Parasites":43-5o
5th Symposium of the British Society for Parasitology Angela, E.R. Taylor (eds.)
Oxford: Blackwell Scientific Publications

177. ____ (1967a): Immunity to Eimeria brunetti and Eimeria maxima infections in the fowl.
Parasitology 57, 363-37o

178. ____ (1967b): Immunity to Eimeria tenella and Eimeria necatrix infections in the fowl.
I. Influence of the site of infection and the stage of the parasite.
II. Cross - protection.
Parasitology 57, 567-583

179. ____ (1963): Some aspects of immunity to Eimeria infections.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 113, 383

180. ____ and P.L.LONG (1962): Immunity to four species of Eimeria in fowls.
Immunology 5, 79-92

181. ROSE,M.E. (1961): The complement - fixation test in hepatic coccidiosis of rabbits.
Immunology 4, 346-353

182. ____ (1959): Serological reactions in Eimeria stiedae infection of the rabbits.
Immunology 2, 112-122

183. ROSENBERG,M.N. and C.A. HERRICK (1950): Hemoglobin values as an index of resistance to cecal coccidiosis.
Poultry Sci. 29, 362-364

184. ROSENCRANTZ,H. (1924): Zur pathologischen Histologie der herdförmigen Veränderungen bei Geflügelcoccidiose.
Arch.f.Wissenschaftl.Tierheilkunde 50, 389-392

185. SEIFRIED,O. (1935): Epithelerneuerung bei A-Avitaminose und Zufuhr von Vitamin-A.
Arch. Tierhk. 69, 250

186. SIEGMANN,O. und E. RADKE (1968): Untersuchungen über das Vorkommen und die wirtschaftliche Bedeutung der verschiedenen Coccidienspecies beim Jungmastgeflügel unter besonderer Berücksichtigung der hygienischen Verhältnisse.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 75, 81-83

187. ____ (1967): Problematik der Coccidiose - Therapie.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr.80, 339-340

188. ____ und R.POHL (1962): Zur Epizootologie der Blinddarm (Eimeria tenella) -Coccidiose der Küken.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 75, 131-133

189. SOULSBY,E.J.L.(1963a): Introductory remarks: Section on host response to parasites.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 113, 381-382

190. SUPPERER,R. (1961): Beitrag zur Diagnose der Hühner-Kokzidiose.
Wiener tierärztl.Mschr. 48, 77-783

191. STEINHAGEN,P. (1968): Ein Beitrag zur Reinigung von Coccidien - Oocysten.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 81, 471-473

192. STOCK,B.L., G.T.STEVENSON, and T.A.HYMAS (1967): Coyden, coccidiostat for control of coccidiosis in chickens.
Poultry Sci. 46, 485

193. SCHNEIDER,J. und K.HAASS (1969): Eimeria acervulina - Kokzidiose bei Legehennen.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 82, 33-36

194. ____ (1967): Möglichkeiten der diagnostischen Abgrenzung von Eimeria (E.) acervulina und Eimeria (E.) mivati - Infektionen bei Hühnern.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 80, 273-275

195. ____ und K.HAASS (1967): Das Auftreten von Blinddarm - (Eimeria tenella) Kokzidiose in Legehuhnbeständen.
Berliner Münchener tierärztl.Wschr. 8o, 11-114

196. SCHOLTYSECK,E. und N.WEISSENFELS (1965): Elektronenmikroskopische Untersuchung von Sporozoen.
I. Die Oocystenmembran des Hühnercoccids Eimeria tenella.
Arch. Protestenk. 1o1, 215-222

197. ____ und W.-H.VOIGT (1964): Die Bildung der Oocystenhülle bei Eimeria perforans (Sporozoa).
Zschr. Zellforsch. 62, 279-292

198. ____ und K.FRENZEN (1963): Therapieversuche und histologische Untersuchungen zur Geflügelcoccidiose.
Angew. Parasit. 4, 129-133

199. ____ (1962a): Electron microscope studies on E. perforans (Sporozoa).
J. Protozool. 9, 4o7-414

2oo. ____ (1962b): Über die Feinstruktur von Eimeria perforans (Sporozoa).
Zschr. Parasitenk. 22, 123-132

2o1. ____ (1962c) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eimerien.
Zschr. Parasitenk. 22, 92

2o2. ____ (1959): Zur Pathologie der Eimeria - maxima - Coccidiose.
Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 175, 3o5-317

2o3. ____ (1955): Therapieversuche und histologische Untersuchungen zur Geflügelcoccidiose.
Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 163, 41o-424

2o4. ____ (1953): Beitrag zur Kenntnis des Entwicklungsganges des Hühnercoccids Eimeria tenella.
Arch. Protistenk. 98, 415-465

2o5. SCHOOP,G., K.H.WAGNER und P.MINNERS (1954): Der Vitamin-A-Mangel als praedisponierender Faktor für Kükenkozidiose.
Mhefte prakt.Tierhk. 6, 154-166

2o6. SCHULEMANN,W. und H.WURMBACH (1939): Die Färbung der Protozoen im Schnittpräparat.
Riv. Parasit. 2o, 377-387

2o7. TORRES,C.M. (1924): Coccidiose, lésions de la moelle osseuse et réaction de Wassermann positive, non spécifique, chez le lapin.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 91, 986-987

2o8. TYZZER,E.E. (1932): Criteria and methods in the investigation of avian coccidiosis.
J.Amer.Vet.Med. Ass. 8o, 474-483 N.S.

2o9. ____, H.THEILER, and E.JONES (1932): Coccidiosis in gallinaceous birds.
II. A comparative study of species of Eimeria of the chicken.
Amer. J. Hyg. 15, 319-393

21o. RYZZER,E.E. (1929a): Methods for isolating and differentiating species of Eimeria occuring in gallinaceous birds. J.Parasit. 15, 148-149

211. ____ (1929b): Coccidiosis in gallinaceous birds. Amer. J. Hyg. 1o, 269-338

212. ____ (1927): Species and strains of coccidia in poultry. J. Parasit. 13, 215

213. WACHENDÖRFER,G. (1958): Über die Immunitätsverhältnisse bei der Coccidiose, insbesondere der Geflügelcoccidiose (Sammelreferat). Dtsch. tierärztl. Wschr. 65, 218-221

214. ____ (1957): Das Problem der Coccidioseimmunität unter besonderer Berücksichtigung der Resistenz und Immunitätsverhältnisse gegen Eimeria tenella. Inaug. Diss. Gießen, 1957

215. WAGNER,W.-H. und O.FOERSTER (1964): Die PAS-AO-Methode. Eine Spezialfärbung für Coccidien im Gewebe. Zschr. Parasitenk. 25, 28-48

216. WAXLER,S.H. (1941): Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of x - ray attenuated oocysts. J. Amer. Vet. Med. Ass. 99, 481-485

217. WEBER,K. (1968): Diätetische Faktoren beim Angehen der Blinddarmkokzidiose des Huhnes. Inaug. Diss. München, 1968

218. WEISSENBERG (1921): zit. nach E.SCHOLTYSECK aus:Therapieversuche und histologische Untersuchungen zur Geflügelcoccidiose. Zbl. Bakt.-Abt. I Orig. 163, 41o-424 (1955)

219. WIGAND,R. (1956): Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Zschr. Hyg. Infektionskrankh. 143, 188-214

22o. ZUCKER,H. (1965): Mineralstoffzufuhr und Kokzidiose. Untersuchungen über den Einfluß einer parasitären Erkrankung auf das Optimum der Calciumversorgung. Mitt. f. Tierhaltung Heft 99, 3

221. ____ (1964): Beziehungen zwischen Calciumkonzentration im Futter, Chlortetracyclin und Mortalitätsrate nach experimenteller Infektion mit Eimeria tenella. Zbl. Vet.Med. 11, 7o6

L e b e n s l a u f

Ich, Peter Steinhagen, wurde am 4.10.1937 in Schwerin in Mecklenburg als Sohn des Landwirtes Peter Steinhagen und dessen Ehefrau Christine Steinhagen, geb. Benckendorff, geboren.

1945 wurde die Familie aus Mecklenburg vertrieben. Der Fluchtweg führte über Schleswig-Holstein nach Hessen, wo ich in Grifte bei Kassel zunächst die Volksschule bis zum Abschluß des vierten Grundschuljahres besuchte. Seit Frühjahr 1950 besuchte ich die Albert-Schweitzer-Schule (Realgymnasium) in Kassel, wo ich am 3.3.1959 die Reifeprüfung ablegte. Zwei Jahre Schulverlust sind durch die Flucht und einen erlittenen Schädelbruch bedingt.

Nach Absolvierung des Wehrdienstes vom 1.4.1959 bis zum 30.8.1960, aus dem ich als Leutnant der Reserve ausschied, begann ich am 4.11.1960 mit dem Studium der Veterinär-Medizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Hier legte ich am 30.10.1962 das Physikum ab und bestand am 30.7.1965 die Tierärztliche Prüfung.

Die Praktikantenzeit leistete ich bei Herrn Dr. Middendorf in Heessen/ Westfalen in der Zeit vom 1.10.1965 bis zum 31.3.1966 ab. Im Anschluß hieran war ich bis zum 31.10.1966 im Institut für Tropische Veterinär-Medizin in Gießen als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt. Seit dem 1.1.1967 bin ich im Landes-Veterinäruntersuchungsamt in Koblenz beschäftigt, in dem ich mich seit dem Sommer 1967 neben den normalen Dienstgeschäften mit der vorliegenden Arbeit befaßt habe.

Ich möchte meine Arbeit nicht beenden, ohne vorher Herrn Prof. Dr. K. Fritzsche für die Überlassung des Themas, die allzeitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung auf das herzlichste zu danken.

Diesen Dank möchte ich ferner allen denen aussprechen, die mich bei der Durchführung der Untersuchungen beraten und unterstützt haben.